



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 196 47 847 A 1

21 Aktenzeichen: 196 47 847.2
22 Anmeldetag: 19. 11. 96
43 Offenlegungstag: 22. 5. 97

51 Int. Cl.⁸:
C 12 N 1/20
C 12 N 1/02
C 12 P 1/00
A 62 D 3/00
B 09 C 1/10
C 12 S 9/00
C 02 F 3/34
C 12 M 1/00
C 12 M 1/12
// (C 12 N 1/20, C 12 R 1:06) (C 12 N 1/20, C 12 R 1:13) (C 12 N 1/20, C 12 R 1:32)

DE 196 47 847 A 1

30 Unionspriorität: 32 33 31
20.11.95 JP 7-301200

71 Anmelder:
Kabushiki Kaisha Toshiba, Kawasaki, Kanagawa, JP

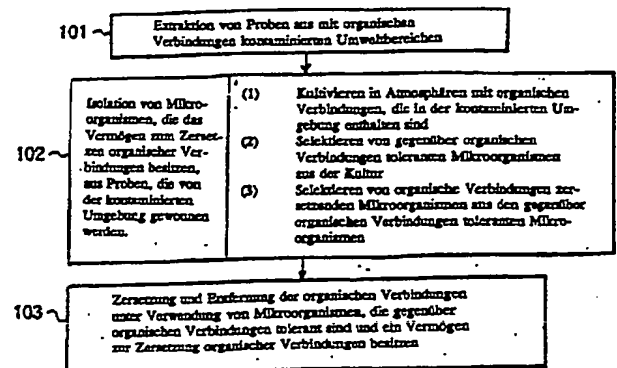
74 Vertreter:
Blumbach, Kramer & Partner, 81245 München

72 Erfinder:
Ikeda, Michio, Fuchu, Tokio/Tokyo, JP; Imamura, Yuko, Tokio/Tokyo, JP; Hirakawa, Chikako, Kobe, Hyogo, JP

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen, Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus und neuer Mikroorganismus

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen, das die Schritte umfaßt, daß man einen Mikroorganismus, der aus der Umgebung entnommen ist, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder eine Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, mit der ersten und/oder einer zweiten organischen Verbindung in Kontakt bringt; und die erste und/oder die zweite organische Verbindung mit dem Mikroorganismus zersetzt. Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen mittels eines Mikroorganismus, die umfaßt: eine Einrichtung zum Halten eines Mikroorganismus, der aus der Umgebung abgeleitet bzw. entnommen ist, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder einer Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist; und eine Einrichtung zum In-Kontakt-bringen des Mikroorganismus, der von der Vorrichtung zum Halten gehalten wird, mit der ersten und/oder einer zweiten organischen Verbindung. Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zum Isolieren von Mikroorganismen, das die Schritte umfaßt, daß man einen Mikroorganismus aus der Umgebung, die mit organischen Verbindungen kontaminiert ist, oder einer Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht, gewinnt; den gewonnenen Mikroorganismus in der Weise kultiviert, daß seine Toleranz gegenüber organischen ...



DE 196 47 847 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 03. 97 702 021/597

43/30

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen durch einen Mikroorganismus, der ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist. Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen mittels eines Mikroorganismus, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus sowie einen neuen, die Fähigkeit zur Zersetzung organischer Verbindungen aufweisenden Mikroorganismus.

Die Abgabe bzw. das Austreten organischer Verbindungen in die Umgebung bzw. Umwelt wurde in den zurückliegenden Jahren ein immer ernsthafteres Problem. Die organischen Verbindungen schließen halogenierte Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Trichlorethylen, Dichlorethylen, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen und 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten sowie aromatische Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Toluol, Phenol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und Kresol ein, die als Reinigungsmittel in verschiedenen Arten von Anlagen verwendet werden. Was die Verwendung organischer Verbindungen angeht, werden derzeit Untersuchungen im Hinblick auf eine Beschränkung von deren Gebrauch durchgeführt. Jedoch sind die Umweltbereiche, die bereits durch organische Verbindungen kontaminiert wurden, wie beispielsweise kontaminiertes Erdreich und kontaminiertes Grundwasser, Probleme, die noch zu lösen bleiben.

Unter diesen Umständen wurden Untersuchungen mit dem Ziel einer Reinigung der Umgebungsbereiche wie beispielsweise Boden und Grundwasser durchgeführt, die durch organische Verbindungen kontaminiert sind. Beispielsweise wurden Vorschläge zum Reinigen der kontaminierten Umgebungsbereiche durch physikalische Verfahren wie beispielsweise Dampfextraktion aus dem Boden und Verbrennen gemacht. Als eine Verfahrensweise, die preiswert ist und zu einer geringeren Umweltbelastung führt als die genannten physikalischen Verfahren, hat ein Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Umgebungsbereiche kontaminieren, durch einen Mikroorganismus Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Als Verfahrensweisen zur direkten Behandlung von organischen Verbindungen sind thermische oder optische Zersetzungsverfahren bekannt. Das Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen durch einen Mikroorganismus hat jedoch Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da dieses Verfahren den oben genannten Behandlungsverfahren im Hinblick auf Kosten und praktische Durchführbarkeit überlegen ist.

Als Beispiele eines Verfahrens zum Zersetzen organischer Verbindungen durch einen Mikroorganismus wurden vorgeschlagen ein Verfahren unter Verwendung eines methanotropen Mikroorganismus, der den Zusatz von Methan benötigt (siehe japanische offengelegte Patentveröffentlichung Nr. Hei 2-92,274) sowie ein Verfahren unter Verwendung von Bakterien, das eine Induktion durch eine aromatische Verbindung wie beispielsweise Phenol, Toluol oder Kresol benötigt (siehe japanische offengelegte Patentveröffentlichung Nr. Hei 8-66,182). Vorgeschlagen wurde auch ein Verfahren unter Verwendung mutagenisierter Bakterien (siehe japanische offengelegte Patentveröffentlichung Nr. Hei 8-228,767).

Jedoch weisen derartige, herkömmlich angewendete Verfahrensweisen zum Zersetzen organischer Verbindungen durch einen Mikroorganismus Nachteile dahingehend auf, daß es schwierig ist, die Effizienz der Zersetzung (Behandlungseffizienz) der organischen Verbindung aufrechtzuerhalten, da diese Verfahren Zusätze, induzierende Verbindungen bzw. mutagenisierte Bakterien benötigen. Im Fall der Anwendung derartiger Verfahrensweisen auf die Reinigung kontaminierter Umgebungsbereiche kann dadurch eine zusätzliche Kontamination (Sekundärkontamination) hervorgerufen werden, da neue Substanzen einschließlich der Additive und induzierenden Substanzen in die Umgebung abgegeben bzw. abgelassen werden, was nicht zu einer Reinigung der Umwelt führt. Speziell das letztgenannte Verfahren führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer zusätzlichen Kontamination der Umwelt, da es Gebrauch von einem Mikroorganismus macht, der die Induktion des Enzyms durch eine aromatische Verbindung wie beispielsweise Phenol, Toluol oder Kresol benötigt; diese Substanzen sind jedoch gefährlich für die Umwelt. Darüber hinaus ist dann, wenn mutagenisierte Bakterien an die Umwelt abgegeben werden, eine große Bedrohung der Sicherheit der Gesellschaft gegeben.

Mit anderen Worten: Die herkömmlichen Verfahren zum Zersetzen einer organischen Verbindung durch einen Mikroorganismus haben Nachteile dahingehend, daß induzierende Substanzen der Umgebung zugesetzt werden müssen, um Enzyme zu induzieren, die für die Zersetzung nötig sind, oder mutagenisierte Bakterien müssen an die Umgebung zum Zersetzen abgegeben werden. Wenn induzierende Substanzen wie beispielsweise gefährliche Chemikalien erforderlich sind oder mutagenisierte Bakterien an die Umgebung abgegeben werden, ist es in hohem Maße möglich, eine Sekundärkontamination hervorzurufen, wenn derartige herkömmliche Verfahrensweisen auf die Reinigung der kontaminierten Umgebung angewendet werden, so daß es schwierig ist, die durch organische Verbindungen kontaminierte Umwelt zu reinigen. Darüber hinaus haben die Verfahrensweisen zum Zersetzen organischer Verbindungen durch Mikroorganismen auch den Nachteil, daß es schwierig ist, die praktische Durchführung der Zersetzung und die Effizienz der Zersetzung aufrechtzuerhalten, da die zusätzlichen Substanzen bzw. Additive und induzierenden Substanzen erforderlich sind.

Daher ist es in hohem Maße verlangt worden, ein Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen zu schaffen, mit dem beispielsweise organische Verbindungen in der kontaminierten Umgebung effizient zersetzt werden können, ohne irgendwelche neuen Substanzen wie beispielsweise Additive und induzierende Substanzen oder mutagenisierte Bakterien an die Umwelt abzugeben, und mit dem der Verfahrensschritt der Zersetzung und die Effizienz der Zersetzung der organischen Verbindung in einfacher Weise aufrechterhalten werden können. Gewünscht war außerdem, Mikroorganismen bereitzustellen, die in wirksamer Weise organische Verbindungen zersetzen können, ohne daß sie dazu neue Substanzen wie beispielsweise Additive oder induzierende Substanzen benötigen. Gewünscht war auch die Bereitstellung eines Verfahrens zum Isolieren von Mikroorganismen, mit dem die wie oben beschrieben gewünschten Mikroorganismen in einfacher Weise isoliert werden können.

Die Erfindung wurde zum Abschluß gebracht, um die oben angesprochenen Nachteile zu überwinden, und zielt darauf ab, ein Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen bereitzustellen, mit dem in wirksamer Weise organische Verbindungen zersetzt werden können, ohne daß dies den Zusatz eines Additivs oder einer induzierenden Substanz erfordert, und mit dem man dann, wenn das Verfahren auf die Reinigung beispielsweise kontaminierter Umgebungsbereiche angewendet wird, die Belastung der Umwelt auf das Äußerste senken kann. Ziel der Erfindung war es auch, eine Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen unter Anwendung des Verfahrens zum Zersetzen organischer Verbindungen bereitzustellen. Ziel der Erfindung war es außerdem, ein Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus zu schaffen, mit dem in effizienter Weise ein Mikroorganismus isoliert werden kann, der im Zusammenhang mit dem biologischen Abbau organischer Verbindungen wirksam ist. Ziel der Erfindung war es letztlich auch, einen neuen Mikroorganismus bereitzustellen, der in effizienter Weise organische Verbindungen zersetzen kann, ohne daß er hierfür irgendwelche Additive oder induzierende Substanzen benötigt.

Das Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung umfaßt die Schritte, daß man einen Mikroorganismus, der aus der Umgebung entnommen bzw. abgeleitet ist, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder eine Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht und das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, mit der ersten und/oder einer zweiten organischen Verbindung in Kontakt bringt, und die erste und/oder die zweite organische Verbindung mit Hilfe des Mikroorganismus zersetzt.

Darüber hinaus umfaßt das Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung die Schritte, daß man einen Mikroorganismus aus der Umgebung, die durch eine erste organische Verbindung kontaminiert ist, oder eine Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht, aufnimmt bzw. gewinnt und den gewonnenen Mikroorganismus kultiviert, wobei seine Toleranz gegenüber organischen Verbindungen als Index verwendet wird, und den kultivierten Mikroorganismus selektiert und den selektierten Mikroorganismus mit dem Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen als Index erneut selektiert und den erneut selektierten Mikroorganismus mit der ersten und/oder zweiten organischen Verbindung in Kontakt bringt und die erste und/oder zweite organische Verbindung mittels des Mikroorganismus zersetzt.

Das Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung umfaßt außerdem die Schritte, daß man einen Mikroorganismus aus der Umgebung, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder eine Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht, aufnimmt bzw. gewinnt, den gewonnenen Mikroorganismus unter denselben Existenzbedingungen der ersten organischen Verbindung wie unter denen der Umgebung oder der mit der Umgebung in Kontakt stehenden Probe kultiviert, den kultivierten Mikroorganismus selektiert, den selektierten Mikroorganismus mit dessen Fähigkeit zum Zersetzen organischer Verbindungen als Index erneut selektiert und den erneut selektierten Mikroorganismus mit der ersten und/oder zweiten organischen Verbindung in Kontakt bringt und die erste und/oder zweite organische Verbindung mit Hilfe des Mikroorganismus zersetzt.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung umfaßt eine Einrichtung zum Halten eines Mikroorganismus, der von der Umgebung abgeleitet ist, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder einer Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht und das Vermögen zum Zersetzen einer organischen Verbindung aufweist, und eine Einrichtung zum In-Kontakt-Bringen des Mikroorganismus, der durch die Einrichtung zum Halten gehalten wird, mit der ersten und/oder zweiten organischen Verbindung.

Außerdem umfaßt das Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus gemäß der Erfindung die Schritte, daß man einen Mikroorganismus aus der Umgebung, die durch organische Verbindungen kontaminiert ist, oder einer mit der Umgebung in Kontakt stehenden Probe gewinnt, den gewonnenen Mikroorganismus kultiviert, so daß seine Toleranz gegenüber organischen Verbindungen als Index verwendet wird, den kultivierten Mikroorganismus selektiert und den selektierten Mikroorganismus unter Verwendung seines Vermögens zum Zersetzen organischer Verbindungen erneut selektiert. Außerdem umfaßt das Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus gemäß der Erfindung die Schritte, daß man einen Mikroorganismus aus der Umgebung, die durch organische Verbindungen kontaminiert ist, oder eine mit der Umgebung in Kontakt stehende Probe gewinnt, den gewonnenen Mikroorganismus unter denselben Existenzbedingungen wie die organische Verbindung kultiviert, den kultivierten Mikroorganismus selektiert und den selektierten Mikroorganismus unter Ausnutzung seines Vermögens zum Zersetzen organischer Verbindungen als Index erneut selektiert.

Der neue Mikroorganismus gemäß der Erfindung ist isoliert und weist das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen auf. Er ist dadurch gekennzeichnet, daß er zu den Gattungen (Genus) Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter gehört.

Der neue Mikroorganismus gemäß der Erfindung wurde isoliert und identifiziert und weist alle charakteristischen Identifikations-Merkmale des Mikroorganismus mit der Hinterlegungs-Nummer YMCT-001 (FERM BP-5282) auf.

Ein erstes Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung macht Gebrauch von einem Mikroorganismus, der von der kontaminierten Umwelt entnommen bzw. abgeleitet ist und das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, um die organischen Verbindungen zu zersetzen.

In einem zweiten Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung wird ein Mikroorganismus, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, aus der Umgebung isoliert, die mit organischen Verbindungen kontaminiert ist, oder man isoliert eine Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht und Toleranz gegenüber organischen Verbindungen sowie das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen als Index aufweist, und nutzt den isolierten Mikroorganismus, um die organischen Verbindungen zu zersetzen.

Außerdem stellt ein drittes Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung die

Bedingungen zum Kultivieren der Mikroorganismen so ein, daß die Existenzbedingungen der organischen Verbindungen präzise identisch mit denen der organischen Verbindungen werden, die in der Umgebung existieren, oder mit der Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht, um die Mikroorganismen zu selektieren. Ein Mikroorganismus, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, wird von den selektierten Mikroorganismen isoliert, und der isolierte Mikroorganismus wird zum Zersetzen der organischen Verbindungen verwendet. Der Ausdruck "Existenzbedingungen von organischen Verbindungen", wie er im Rahmen der Beschreibung und der Patentansprüche verwendet wird, ist ein allgemeiner Gedanke der gleichzeitigen Angabe aller Bedingungen wie Arten der organischen Verbindungen, Mengen, bestehende Mengenverhältnisse, bestehende Formen (Gas, Flüssigkeit, Feststoff) und dergleichen.

Die Mikroorganismen, die zum Zersetzen der organischen Verbindungen verwendet werden, weisen Toleranz gegenüber organischen Verbindungen auf und können mit den organischen Verbindungen als einziger Kohlenstoff-Quelle wachsen, so daß die organischen Verbindungen sehr wirksam zersetzt werden können, ohne daß dafür irgendein Zusatzstoff oder eine induzierende Substanz erforderlich ist. Darüber hinaus ist es einfach, ein System zum Zersetzen organischer Verbindungen zu erhalten und die Effizienz der Zersetzung der organischer Verbindungen zu stabilisieren.

Außerdem kann durch eine Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, auf die das erste, zweite oder dritte Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen angewendet wird, die Aufrechterhaltung des Vermögens zum Zersetzen organischer Verbindungen und die Stabilisierung der Zersetzungseffizienz einfacher realisiert werden. Daher ist dann, wenn das Verfahren zum Zersetzen der organischen Verbindungen gemäß der Erfindung auf die Reinigung von kontaminierten Umgebungsbereichen angewendet wird, der Einfluß auf die Umgebung sehr gering, und eine Sekundärkontamination wird nicht hervorgerufen, da dieses Verfahren den Zusatz irgendwelcher Additive oder induzierender Substanzen nicht erfordert und da der Mikroorganismus selbst aus der kontaminierten Umgebung gewonnen wird.

Der Begriff "organische Verbindungen" gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein allgemeiner Begriff für verschiedene Arten organischer Verbindungen. Beispiele hierfür sind halogenierte Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen und 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten sowie aromatische Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Toluol, Phenol, Kresol, Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, Bromnaphthalin und polychloriertes Biphenyl.

Außerdem wird der Begriff "Mikroorganismen" im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet als allgemeiner Grundbegriff und schließt verschiedene Arten von Bakterien, Actinomyceten, Schimmelpilze, Hefen, Myxomyceten, Algen und Protozoen ein.

Die Mikroorganismen wie z. B. Bakterien, die zum Zersetzen der organischen Verbindungen verwendet werden und von der kontaminierten Umgebung abgeleitet bzw. entnommen sind, weisen eine Toleranz gegenüber organischen Verbindungen auf und können allgemein Kolonien in der kontaminierten Umgebung bilden. Es ist darüber hinaus in besonderem Maße möglich, daß organische Verbindungen, die in verdampfter Form zugegen sind, direkt mit den Kolonien in der Atmosphäre (Gasphase) in Kontakt gebracht werden. In diesem Fall sind die Mikroorganismen, die zum Zersetzen der organischen Verbindungen verwendet werden und von der kontaminierten Umgebung entnommen bzw. abgeleitet sind, vorzugsweise Mikroorganismen, die direkt die organische(n) Verbindung(en) aus der Atmosphäre (Gasphase) aufnehmen können und sie als Kohlenstoff-Quelle nutzen können, so daß sie die organischen Verbindungen biologisch zersetzen können, die in Flüssigkeiten eingeschlossen sind und die auch in verdampfter Form in der Atmosphäre zugegen sind.

Wenn von den Mikroorganismen, die die oben beschriebenen Eigenschaften aufweisen und von denen angenommen wird, daß sie in vielen Arten existieren, Bakterien, die beispielsweise zum Genus Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter gehören, in dem Verfahren und der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung verwendet werden, können diese Bakterien direkt die verdampften organischen Verbindungen aus der Atmosphäre (Gasphase) aufnehmen und sie als Kohlenstoff-Quelle verwenden, so daß die organischen Verbindungen in der in die Atmosphäre (Gasphase) verdampften Form biologisch zersetzt werden können. Wenn jedoch ein neuer Mikroorganismus, der zum Genus Komagatella gehört und nachfolgend beschrieben wird, speziell Komagatella brevis, in dem Verfahren und in der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung verwendet wird, weist Komagatella brevis ein gutes Vermögen zur direkten Aufnahme der verdampften organischen Verbindungen aus der Atmosphäre (Gasphase) auf und nutzt diese als Kohlenstoff-Quelle, so daß die in verdampfter Form in der Atmosphäre (Gasphase) vorliegenden organischen Verbindungen wirksam biologisch zersetzt werden können.

In dem ersten und zweiten Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus gemäß der Erfindung werden die aus der kontaminierten Umgebung gewonnenen Mikroorganismen unter solchen Bedingungen kultiviert, daß eine hohe Konzentration organischer Verbindungen in den Fällen vorliegt, in denen die Toleranz gegenüber organischen Verbindungen als Index verwendet wird, so daß Mikroorganismen, die eine hohe Toleranz gegenüber organischen Verbindungen aufweisen, in wirksamer Weise selektiert werden können. Darüber hinaus kann deswegen, weil ein Mikroorganismus, der ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, aus den Mikroorganismen selektiert wird, die unter Anwendung allein der Toleranz gegenüber organischen Verbindungen als Index selektiert wurden, ein Mikroorganismus in effizienter Weise isoliert werden, der den anderen Mikroorganismen im Hinblick auf die Eigenschaften der Zersetzung organischer Verbindungen und die Eigenschaft der Erhaltung der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen überlegen ist. Da die physiologischen Anforderungen allgemein unterschiedlich sind, und zwar in Abhängigkeit von der Mikroorganismen-Spezies, können verschiedene Arten von Mikroorganismen dadurch isoliert werden, daß man in geeigneter Weise

die Komponenten und die Form des Kulturmediums variiert, ohne auf ein einzelnes Kulturmedium beschränkt zu sein, und indem man auch in geeigneter Weise die Bedingungen wie beispielsweise die Temperatur einstellt. Ein Mikroorganismus, der bestimmte Eigenschaften aufweist, kann in einfacher Weise isoliert werden, indem man den Mikroorganismus unter vorgeschriebenen Kulturbedingungen kultiviert.

Gemäß dem ersten Verfahren zur Isolierung eines Mikroorganismus kann in einfacher Weise ein derartiger Mikroorganismus, der spezielle Eigenschaften aufweist, dadurch selektiert werden, daß man Mikroorganismen unter willkürlich bestimmten Kulturbedingungen kultiviert. Darüber hinaus kann im Rahmen des zweiten Verfahrens zum Isolieren eines Mikroorganismus in sicherer Weise ein Mikroorganismus, der Toleranz gegenüber organischen Verbindungen aufweist, selektiert werden, indem man Mikroorganismen unter den existierenden Bedingungen der organischen Verbindungen in der Weise kultiviert, daß diese identisch mit der Umgebung sind, in der die Mikroorganismen gewonnen wurden, und kann in wirksamer Weise einen Mikroorganismus isolieren, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung erhält einen Mikroorganismus, der aus der Umgebung isoliert wurde, die durch eine erste organische Verbindung kontaminiert ist, oder eine Probe, die von der kontaminierten Umgebung gewonnen wurde, und der eine hohe Toleranz gegenüber organischen Verbindungen und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, und bringt den erhaltenen Mikroorganismus mit der ersten oder zweiten organischen Verbindung in Kontakt, so daß es einfach ist, das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufrechtzuerhalten und die Zersetzungseffizienz zu stabilisieren. Die erste und die zweite organische Verbindung können solche Verbindungen der oben beschriebenen unterschiedlichen Arten sein.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung ist nicht auf eine spezielle Zersetzungsanordnung beschränkt. Sie kann eine Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen sein, die von einer Betriebsweise unter Anwendung eines Biobandes, einer Betriebsweise unter Verwendung eines Bioreaktors, einer Betriebsweise unter Verwendung eines Biofilters, einer Betriebsweise unter Verwendung einer Injektion oder einer Betriebsweise unter Verwendung einer Biosäule Gebrauch macht.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die von der Betriebsweise unter Verwendung einer Biobandes Gebrauch macht, ist in der Weise aufgebaut, daß der Mikroorganismus, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, insbesondere der neue Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung, in das Innere einer hydrophoben porösen Membran eingetragen wird, die hydrophobe poröse Membran, die den Mikroorganismus trägt, im Boden eingegraben wird, um die in dem Bodenmaterial enthaltenen organischen Verbindungen in die hydrophobe poröse Membran einzulassen, wofür als Antriebskraft die Haftung der organischen Verbindungen an der hydrophoben porösen Membran oder die Verdampfungskraft der organischen Verbindungen benutzt wird, und die organischen Verbindungen durch die Mikroorganismen innerhalb der hydrophoben porösen Membran zersetzt werden. In der Vorrichtung zur Zersetzung organischer Verbindungen, die von der Betriebsweise unter Verwendung eines Biobandes Gebrauch macht, dient die hydrophobe poröse Membran als Einrichtung zum Halten der Mikroorganismen und als Kontaktmittel zum In-Kontakt-Bringen der durch die Einrichtung zum Halten gehaltenen Mikroorganismen mit den organischen Verbindungen.

Es ist bevorzugt, als hydrophobe poröse Membran eine poröse Substanz zu verwenden, die mit dem Ziel, daß ihr hydrophobe Eigenschaften verliehen werden, mit Teflon oder dergleichen behandelt wurde, oder eine poröse Substanz zu verwenden, die ein hydrophobes Material wie beispielsweise Teflon oder dergleichen enthält. Durch Einstellen der hydrophoben Eigenschaften der hydrophoben porösen Membran kann die Verdampfungskraft des Grundwassers in wirksamer Weise als Triebkraft zum Zeitpunkt der Einführung der organischen Verbindungen in die hydrophobe poröse Membran verwendet werden.

In Übereinstimmung mit der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die von der Betriebsweise unter Verwendung eines Biobandes Gebrauch macht, können die organischen Verbindungen in wirksamer Weise zersetzt werden, ohne daß in irgendeiner Weise eine Wartung oder Energie benötigt wird, nachdem die Zersetzungsanordnung im Boden vergraben wurde.

Der Begriff "Boden" wird als allgemeiner Begriff verwendet und schließt jedweden Umgebungsbereich unter der Erdoberfläche ein, beispielsweise Erdreich, in der Erde enthaltenes Wasser, Grundwasser und irgendein Medium, das die genannten Materialien enthält.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die von der Betriebsweise unter Verwendung eines Bioreaktors Gebrauch macht, bringt das abgepumpte Grundwasser, im Vakuum extrahiertes Gas oder abgegrabene Erde mit dem Mikroorganismus in Kontakt, der ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist und in dem Bioreaktor gehalten wird, insbesondere mit dem neuen Mikroorganismus gemäß der Erfindung, um die organischen Verbindungen innerhalb des Bioreaktors zu zersetzen. In der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Verfahrensweise unter Verwendung eines Bioreaktors macht, ist die Einrichtung zum Halten des Mikroorganismus allgemein ein Reaktionsgefäß, das von der Außenumgebung isoliert ist, und die Einrichtung zum In-Kontakt-Bringen des durch die Einrichtung zum Halten gehaltenen Mikroorganismus mit den organischen Verbindungen ist eine Pumpe oder ein Einlaßrohr zum Einlassen des Grundwassers, des im Vakuum extrahierten Gases oder des abgegrabenen Erdmaterials in das Reaktionsgefäß des Bioreaktors.

Um den Mikroorganismus in dem Reaktionsgefäß zu halten, das gegenüber der Außenumgebung isoliert ist, und um den Mikroorganismus in Kontakt mit den organischen Verbindungen in dem Bioreaktor zu bringen, werden die Umgebungsbedingungen in dem Reaktionsgefäß wie beispielsweise der pH-Wert, die Temperatur und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff auf eine geeignete Größe gemäß den physiologischen Erfordernissen des in dem Reaktionsgefäß gehaltenen Mikroorganismus eingestellt, so daß die Wirksamkeit der Zersetzung der organischen Verbindungen durch den Mikroorganismus verbessert wird und die Reaktion zum Zersetzen

zen der organischen Verbindungen durch den Mikroorganismus für eine lange Zeit erhalten werden kann. Mit anderen Worten: Wünschenswerterweise wird die Umgebung innerhalb des Bioreaktors in einem solchen Zustand gehalten, daß die Reaktion der Zersetzung der organischen Verbindungen durch die Mikroorganismen bestmöglich abläuft. Da der Zustand, bei dem die Reaktion zur Zersetzung der organischen Verbindungen am besten abläuft, in Abhängigkeit von der Spezies des Mikroorganismus variabel ist, werden die Umgebungsbedingungen in dem Bioreaktor entsprechend den Erfordernissen der Spezies des Mikroorganismus, der in dem Reaktionsgefäß gehalten wird, nach den Erfordernissen geändert. Daher kann in der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die von der Betriebsweise unter Verwendung eines Bioreaktors Gebrauch macht, selbst ein Mikroorganismus zum Zersetzen der organischen Verbindungen verwendet werden, der eine Aktivität zum Zersetzen organischer Verbindungen in natürlicher Umgebung nicht beibehält. Außerdem wird die Menge an zugepumpten Grundwasser, Vakuum-extrahiertem Gas oder abgegrabener Erde so eingestellt, daß die Aktivität der Zersetzung der organischen Verbindungen innerhalb des Reaktionsgefäßes möglichst hoch wird, und wird dann in das Reaktionsgefäß eingeführt, in dem der Mikroorganismus gehalten wird.

Außerdem ist es bei dem Ziel, den Mikroorganismus in dem Reaktionsgefäß des Bioreaktors zu halten, möglich, den Mikroorganismus in freiem Zustand zu halten, indem man den Mikroorganismus in einer Kulturlösung schwimmen läßt. Bevorzugt ist es jedoch, den Mikroorganismus auf einem geeigneten Träger zu fixieren. Dadurch daß man den Mikroorganismus auf einem Träger fixiert, kann der Mikroorganismus in hoher Dichte gehalten werden, und die organischen Verbindungen können noch wirksamer zersetzt werden. Ein derartiger Träger kann je nach Spezies des Mikroorganismus entsprechend den Anforderungen geändert werden. Es ist jedoch bevorzugt, daß der Reaktor eine poröse Substanz enthält, die als Träger des Mikroorganismus dienen kann. Es ist erwünscht, daß eine derartige poröse Substanz in der Lage ist, für den Mikroorganismus beispielsweise einen Mikro-Standort (microhabitat) zu bilden. Der Mikro-Standort ist ein sehr kleiner Standort für den Mikroorganismus in einem Porenraum von einigen Mikrometern.

Die poröse Substanz kann verschiedene Formen aufweisen, beispielsweise Teilchen oder Schichten, und kann eine Verbindung oder können zwei oder mehrere Verbindungen aus porösen Substanzen sein, die ein anorganisches Material aus Erdteilchen, die eine Kugelstruktur aufweisen, beispielsweise Keramikmaterialien, Glas, Calciumsilicat, Siliciumoxid, Aluminiumoxid und Kanumatsuchi, sowie ein organisches Material wie beispielsweise Aktivkohle, Urethanschäum, unter Lichteinfluß härtende Harze, Anionen-Austausch-Harze, Cellulose, Lignin, Chitin und Chitosan umfassen. Es ist erwünscht, daß eine derartige poröse Substanz preiswert ist. Darüber hinaus ist es erwünscht, daß sie eine Struktur aufweist, die geeignet dafür ist, Mikroorganismen zu halten und wachsen zu lassen, vorzugsweise daß sie Porenräume von beispielsweise einigen Mikrometern bis zu einigen 10 Mikrometern aufweist. Träger, die beispielsweise Calciumalginat-Gel, Agarose-Gel oder Carrageen-Gel enthalten oder in ihrem Inneren fixieren, können ebenfalls bevorzugt sein. Außerdem könnten sie als Kombinationsträger aus porösem Substrat und hydrophilem Gel verwendet werden.

Außerdem bringt die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die von der Betriebsweise unter Verwendung eines Biofilters Gebrauch macht, das im Vakuum extrahierte Gas, das organische Verbindungen enthaltene Gas oder dergleichen mit dem Mikroorganismus, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist und der auf dem Filter als Trägermaterial aufgebracht ist, in einem Filtergehäuse in Kontakt, insbesondere den neuen Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung, um die organischen Verbindungen innerhalb des Filtergehäuses zu zersetzen. In der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die von der Verfahrensweise unter Verwendung eines Biofilters Gebrauch macht, ist die Einrichtung zum Erhalten des Mikroorganismus allgemein das Filtergehäuse, das von der Außenumgebung isoliert ist, und die Einrichtung zum In-Kontakt-Bringen des Mikroorganismus, der durch die Einrichtung zum Halten erhalten wird, mit den organischen Verbindungen ist eine Pumpe oder ein Einleitrohr zum Einleiten des im Vakuum extrahierten Gases in das Filter innerhalb des Filtergehäuses.

In der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Betriebsweise unter Verwendung eines Biofilters macht, werden zum Erhalten der Mikroorganismen in dem Filtergehäuse, das von der Außenumgebung isoliert ist, und zum In-Kontakt-Bringen des Mikroorganismus mit den organischen Verbindungen die Umgebungsbedingungen in dem Filtergehäuse wie beispielsweise die Temperatur und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff auf einem optimalen Wert in Übereinstimmung mit den physiologischen Erfordernissen des in dem Filtergehäuse gehaltenen Mikroorganismus gehalten, so daß die Effizienz zum Zersetzen organischer Verbindungen durch den Mikroorganismus erhöht wird und die Reaktion zum Zersetzen der organischen Verbindungen durch den Mikroorganismus über eine lange Zeit aufrechterhalten werden kann. Mit anderen Worten: Die Umgebungsbedingungen innerhalb des Filtergehäuses werden wünschenswerterweise auf solche Werte eingestellt, daß die Reaktion zum Zersetzen organischer Verbindungen durch den Mikroorganismus bestmöglich abläuft. Da die Bedingungen, bei denen die Reaktion zum Zersetzen organischer Verbindungen am besten abläuft, in Abhängigkeit von der Mikroorganismen-Spezies schwanken, ändern sich die Umgebungsbedingungen in dem Filtergehäuse in Übereinstimmung mit den Erfordernissen der Spezies des Mikroorganismus, der in dem Reaktionsgefäß gehalten wird. Daher können in der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Verfahrensweise unter Verwendung eines Biofilters macht, selbst Mikroorganismen, die eine Aktivität zum Zersetzen organischer Verbindungen in natürlicher Umgebung nicht beibehalten können, zum Zersetzen der organischen Verbindung n verwendet werden. Darüber hinaus wird die Menge an Vakuum-extrahiertem Gas oder dergleichen auf einen solchen Wert eingestellt, daß die Aktivität zum Zersetzen organischer Verbindungen innerhalb des Filtergehäuses am höchsten wird, und wird dann in das Filtergehäuse eingeleitet, in dem der Mikroorganismus gehalten wird.

Um den Mikroorganismus in dem Filtergehäuse zu halten, wird der Mikroorganismus trägerartig auf einem geeigneten Filtermaterial aufgebracht, und Materialien für das Filter schließen Filterpapier, Vliesmaterialien oder Webmaterial unterschiedlicher Art aus natürlichen Fasern oder Kunststoff-Fasern und Kunststoff-Schaum

ein. Als Filter können die oben beschriebenen verschiedenen Arten von Trägern verwendet werden. Die Filtermaterialien werden aus solchen Materialien gewählt, die durch die organischen Verbindungen nicht gelöst werden.

Durch die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Verfahrensweise unter Verwendung eines Biofilters macht, können die organischen Verbindungen, die in dem extrahierten Gas enthalten sind, in wirksamer Weise zersetzt werden. Diese Vorrichtung wird oft zum Zersetzen von organischen Verbindungen eingesetzt, die in einem ungesättigten Bereich des Erdbodens vorhanden sind.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Betriebsweise unter Anwendung einer Injektion macht, gibt den Mikroorganismus, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, insbesondere den neuen Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung, in Erdmaterial, um die organischen Verbindungen durch den Mikroorganismus, der in das Erdmaterial eingegeben wurde, in der natürlichen Umgebung zu zersetzen. In der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Verfahrensweise unter Anwendung einer Injektion macht, ist die Einrichtung zum Halten des Mikroorganismus allgemein ein Kulturtank, der den Mikroorganismus in der Form enthält, in der er in die Umgebung wie beispielsweise in eine Bodenprobe gegeben werden soll, und die Einrichtung zum In-Kontakt-Bringen des Mikroorganismus, der in der Einrichtung zum Halten gehalten wird, mit den organischen Verbindungen ist, eine Transportpumpe oder ein Zufuhrrohr, mit dem der Mikroorganismus in die Umgebung durch die Halteeinrichtung gegeben wird.

Zur Anwendung einer Verfahrensweise, bei der der Mikroorganismus direkt in Kontakt mit den organischen Verbindungen der Umgebung gebracht wird, ist es bevorzugt, daß der Mikroorganismus, von dem bekannt ist, daß er organische Verbindungen zersetzt, die in der Umgebung vorhanden sind, z. B. der neue Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung, vorher kultiviert wird, um eine geeignete Menge pro Volumeneinheit bzw. Konzentration zu erreichen, und anschließend wird der kultivierte Mikroorganismus in die Umgebung wie beispielsweise in eine Bodenprobe abgegeben. Um den Mikroorganismus in die Umgebung abzugeben, ist es erwünscht, daß — je nach Bedarf — eine Substanz wie beispielsweise Glucose oder Sauerstoff in einer geeigneten Menge in die Umgebung abgegeben wird, um eine Lebensumgebung für den Mikroorganismus zu schaffen und die Aktivität des Mikroorganismus zu verbessern und die Geschwindigkeit der Reaktion der Zersetzung der organischen Verbindungen durch den Mikroorganismus in der Umgebung zu beschleunigen. Es ist erwünscht, daß die Substanz, z. B. Glucose, in Form einer flüssigen Lösung und nicht in Form eines Feststoffes an die Umgebung abgegeben wird, so daß der Mikroorganismus die Substanz bequem nutzen kann und ein Verlust an Zeit und Energie in Bezug auf die Arbeit des Einrührens minimiert werden kann.

Wenn außerdem die Substanz wie beispielsweise Glucose oder Sauerstoff in geeigneter Menge getrennt von dem Mikroorganismus an die Umgebung abgegeben wird, kann der Mikroorganismus und die Substanz wie beispielsweise Glucose und Sauerstoff separat an die Umgebung abgegeben werden; es ist jedoch bevorzugt, die Lösungen vorab zu mischen, um den Mikroorganismus in einen optimalen Zustand zu versetzen, bevor er an die Umgebung abgegeben wird, und ihn dann an die Umgebung abzugeben.

Wenn das Verfahren des direkten In-Kontakt-Bringens des Mikroorganismus mit den organischen Verbindungen in der Umgebung angewendet wird, befindet sich der Mikroorganismus vorzugsweise auf einem Träger. Durch Bereitstellen des Mikroorganismus auf dem Träger kann der Mikroorganismus in hoher Dichte gehalten werden und vor einem Überlebenskampf mit anderen Mikroorganismen geschützt werden, so daß die organischen Verbindungen in effizienter Weise zersetzt werden können. Ein derartiger Träger kann in Übereinstimmung mit der Mikroorganismus-Spezies je nach Bedarf geändert werden, ist jedoch allgemein eine poröse Substanz, wie sie oben beschrieben wurde. Es ist erwünscht, daß eine derartige poröse Substanz in der Lage ist, das Mikro-Habitat für den Mikroorganismus zu bilden. Das Mikro-Habitat dient dazu, den Mikroorganismus gegenüber nachteiligen Umweltbedingungen zu schützen. Selbst wenn beispielsweise die Außenumgebung so trocken wird, daß das Weiterleben des Mikroorganismus beeinträchtigt werden kann, enthält das Mikro-Habitat Kapillärwasser, so daß die Wasserzufuhr in den Mikroorganismus aufrechterhalten werden kann. Außerdem wird der Mikroorganismus innerhalb des Mikro-Habitats davor geschützt, von Protozoen oder dergleichen in der Umgebung wie beispielsweise in der Bodenprobe eingefangen und aufgefressen zu werden. Daher kann die Überlebensfähigkeit des Mikroorganismus dadurch verbessert werden, daß man künstlich das Mikro-Habitat in Form des Trägers ausbildet, der die poröse Substanz enthält.

Es ist erwünscht, daß die poröse Substanz preiswert ist. Darüber hinaus ist es im Hinblick auf ihre Anwendung in der Weise, daß man sie in die Umgebung wie beispielsweise in eine Bodenprobe abgibt, erwünscht, die Dispergierbarkeit oder Bewegbarkeit in der Umgebung wie beispielsweise in einer Bodenprobe nicht zu verschlechtern. Beispielsweise liegt die poröse Substanz vorzugsweise in Form von Teilchen mit einem Teilchendurchmesser von 1 µm bis 10 mm vor. Es ist auch erwünscht, daß sie eine Struktur aufweist, die dafür geeignet ist, den Mikroorganismus zu erhalten und zu züchten. Vorzugsweise sollte die poröse Substanz Porenräume mit einem Durchmesser von 100 nm bis 100 µm aufweisen, um nur Beispiele zu nennen.

Darüber hinaus wird bei der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die von der Betriebsweise unter Verwendung einer Biosäule Gebrauch macht, der Mikroorganismus, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, insbesondere der neue Mikroorganismus gemäß der Erfindung, oder ein Träger, der den Mikroorganismus trägt, in einen Zylinder gefüllt, der eine für Wasser durchlässige Substanz umfaßt, und der Zylinder wird in die Erde eingegraben, um das Wasser, das durch Permeation in den Zylinder eindringt, mit den in dem Zylinder gehaltenen Mikroorganismen in Kontakt zu bringen. Dadurch werden die organischen Verbindungen durch den innerhalb des Zylinders befindlichen Mikroorganismus zersetzt. In der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Verfahrensweise unter Verwendung einer Biosäule Gebrauch macht, dient der Zylinder als Halteeinrichtung zum Halten des Mikroorganismus und auch als Kontakteinrichtung, wobei Untergrundwasser, das sich im Boden bewegt, in den Zylinder durch

Permeation eindringt.

Als für Wasser permeable Substanz, die den Zylinder bildet, kann ein Metall, das eine poröse Struktur aufweist, ein Keramikmaterial, das eine poröse Struktur aufweist, oder dergleichen verwendet werden. Durch Einstellen der Permeabilität des Zylinders wird das durch Permeation eindringende Wasser in geeigneter Menge mit dem Mikroorganismus in Kontakt gebracht, der in den Zylinder eingefüllt ist, und die organischen Verbindungen können durch den Mikroorganismus zersetzt werden. Als Träger für den Mikroorganismus können die oben beschriebenen verschiedenen Arten von Trägern verwendet werden.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Verfahrensweise unter Verwendung einer Biosäule macht, kann in geeigneter Weise zum Zersetzen der organischen Verbindungen verwendet werden, die hauptsächlich in Grundwasser enthalten sind. Mit der Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, die Gebrauch von der Verfahrensweise unter Verwendung der Biosäule macht, können die organischen Verbindungen in wirtschaftlicher und effizienter Weise zersetzt werden, ohne daß es dabei irgendeiner Wartung oder eines Energieverbrauchs nach dem Eingraben der Zersetzungsanordnung in den Boden bedarf.

Der neue Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung, der das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, wird durch das oben beschriebene Verfahren gemäß der Erfindung zum Isolieren des Mikroorganismus erhalten. Der neue Mikroorganismus umfaßt Bakterien, die zu den Genus Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter gehören und die organische Verbindungen zersetzen.

Der neue Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Bakterium, das zum Genus Komagatella gehört und das erhalten wird durch das Isolationsverfahren der Erfindung. Der neue Mikroorganismus kann organische Verbindungen zersetzen. Er wurde taxonomisch als Komagatella brevis klassifiziert, wie dies nachfolgend beschrieben ist.

Die als Komagatella brevis klassifizierten Bakterien schließen den Stamm YMCT-001 ein, der nachfolgend im einzelnen beschrieben wird. Dieser Stamm ist einer der Bakterienstämme, die als Komagatella brevis klassifiziert wurden. Der Stamm YMCT-001 ist jedoch nicht das einzige Bakterium, das als Komagatella brevis klassifiziert wurde. Mit anderen Worten: Die als Komagatella brevis klassifizierten Bakterien sind Spezies, die auch andere Stämme als den Stamm YMCT-001 enthalten. Die Bakterien, die zu den Genus Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter gehören, werden als Bakterien, die ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, isoliert durch Selektieren der Mikroorganismen mit Toleranz gegen organische Verbindungen in hoher Konzentration als einzigem Index oder Selektieren in der Weise, daß die bestehenden Bedingungen für die organischen Verbindungen so eingestellt werden, daß sie dieselben sind wie in der Umgebung, in der der Mikroorganismus gewonnen wurde. Es ist möglich, die Bakterien mit den organischen Verbindungen als einziger Kohlenstoff-Quelle zu züchten.

Von den zum Genus Komagatella gehörenden Bakterien weist Komagatella brevis ein ausgeprägtes Vermögen zum Zersetzen verschiedener Arten organischer Verbindungen auf. Beispielshaft für die organischen Verbindungen stehen halogenierte Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Trichlorethylen (nachfolgend bezeichnet als "TCE"), cis-Dichlorethylen (nachfolgend bezeichnet als "cis-DCE"), trans-Dichlorethylen (nachfolgend bezeichnet als "trans-DCE"), 1,1-Dichlorethylen (nachfolgend bezeichnet als "1,1-DCE"), Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen und 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten sowie aromatische Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Toluol, Phenol, Kresol, Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychlorierte Biphenyle. Die Bakterien zersetzen diese Verbindungen, ohne daß sie dafür ein Additiv oder eine Derivatsubstanz benötigen.

Komagatella brevis ist tolerant gegenüber organischen Verbindungen, wenn die Konzentration der organischen Verbindungen in der Lebensumgebung des Bakteriums geringer ist als etwa 500 ppm. Das Bakterium wächst unter Zersetzen der in der Umgebung vorhandenen organischen Verbindungen. Allgemein werden bei dem Ziel, gefährliche Substanzen wie beispielsweise organische Verbindungen durch Mikroorganismen zu zersetzen, die Mikroorganismen in einen oligotrophen Zustand gebracht, so daß sie die gefährlichen Substanzen als Kohlenstoff-Quelle nutzen müssen. Der Grund hierfür ist der, daß dann, wenn es Substanzen neben den gefährlichen Substanzen gibt, die von den Mikroorganismen leicht als Kohlenstoff-Quelle genutzt werden können, die Substanzen, die leicht als Kohlenstoff-Quellen genutzt werden können, mit Priorität gegenüber den gefährlichen Substanzen von den Mikroorganismen genutzt werden. Selbst wenn jedoch im Fall von Komagatella brevis eine Kohlenstoff-Quelle wie beispielsweise Glucose, die das Bakterium nutzen kann, zusammen mit organischen Verbindungen in der Umgebung des Bakteriums existiert, baut das Bakterium nicht nur Glucose ab, sondern baut gleichzeitig auch die organischen Verbindungen ab. Im vorliegenden Fall behält Komagatella brevis selbst dann, wenn eine Kohlenstoff-Quelle außer den organischen Verbindungen wie z. B. Glucose in der Lebensumgebung des Bakteriums in einer Menge im Bereich von weniger als 10.000 mg/l neben den organischen Verbindungen existiert, seine Fähigkeit zum Zersetzen der organischen Verbindungen bei. Außerdem können die Bakterien dann, wenn Glucose in einer Menge im Bereich von weniger als 1.800 mg/l zugegen ist, ihre Fähigkeit zum Zersetzen der organischen Verbindungen im gleichen oder sogar in einem höheren Ausmaß beibehalten, als wenn Glucose nicht zugegen wäre. Daher übertrifft Komagatella brevis andere Bakterien im Hinblick auf die Wirksamkeit und Brauchbarkeit bei der Reinigung kontaminierter Umweltbereiche und wird folglich in einem sehr weiten Umfang verwendet.

Darüber hinaus ist die Geschwindigkeit der Zersetzung organischer Verbindungen proportional zur Anzahl der Komagatella brevis-Bakterien bei Beginn des Vorgangs der Zersetzung organischer Verbindungen. Folglich kann durch Einstellen der Anzahl von Bakterienzellen von Komagatella brevis, die in Kontakt mit den organischen Verbindungen kommen, auf der Grundlage der Konzentration der organischen Verbindungen die Ge-

schwindigkeit der Zersetzung der organischen Verbindungen gesteuert werden. Die direkte Zugabe von Komagatella brevis in die organische Verbindungen enthaltende Probe ist eine der Verfahrensweisen, um Komagatella brevis mit organischen Verbindung in Kontakt zu bringen. Wenn jedoch Komagatella brevis auf verschiedenen Trägern immobilisiert wird und in Kontakt mit organischen Verbindungen gebracht wird, wird es möglich, eine große Menge von Bakterienzellen in Kontakt mit den organischen Verbindungen zu bringen; so kann die Geschwindigkeit der Zersetzung der organischen Verbindung weiter gesteigert werden. 5

Das Bakterium gemäß der Erfindung, das zum Genus Komagatella gehört, insbesondere der Stamm YMCT-001, der einer der Stämme ist, die als Bakterien der Art Komagatella brevis klassifiziert wurden, wurde unter der Hinterlegungs-Nr. FERM BP-5282 beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, hinterlegt. 10

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Figuren weiter beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 ein Diagramm, das ein Arbeitsbeispiel des Verfahrens zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung und ein Beispiel des Verfahrens zum Isolieren von Mikroorganismen gemäß der Erfindung zeigt;

Fig. 2 ein Diagramm, das ein Beispiel der Ergebnisse der Zersetzungs-Tests in dem Verfahren zum Selektieren eines Mikroorganismus in dem Beispiel der Verfahrensweise zum Isolieren eines Mikroorganismus zeigt, wie es in Fig. 1 angegeben ist; 15

Fig. 3 einen molekular-genealogischen Baum, der nach dem "neighbor-joining-Verfahren (NJ-Verfahren)" erhalten wurde;

Fig. 4 ein Diagramm, das die Ergebnisse von Zersetzungs-Tests verschiedener organischer Verbindungen unter Verwendung des Stamms YMCT-001 in Ausführungsform 1 zeigt; 20

Fig. 5 ein Diagramm, das die Beziehung zwischen der Anzahl von Bakterien des Stamms YMCT-001 und der Zersetzungsrate von TCE in Ausführungsform 2 zeigt;

Fig. 6 ein Diagramm, das die Rate der Zersetzung von TCE durch den Stamm YMCT-001 bei verschiedenen Konzentrationen von TCE gemäß Ausführungsform 3 zeigt;

Fig. 7 ein Diagramm, das die Rate der Zersetzung von cis-DCE durch den Stamm YMCT-001 bei verschiedenen Konzentrationen von cis-DCE gemäß Ausführungsform 3 zeigt; 25

Fig. 8 ein Diagramm, das die Rate der Zersetzung von trans-DCE durch den Stamm YMCT-001 bei verschiedenen Konzentrationen von trans-DCE gemäß Ausführungsform 3 zeigt;

Fig. 9 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Tests zur Zersetzung von TCE durch den Stamm YMCT-001 in Gegenwart von Glucose gemäß Ausführungsform 4 zeigt; 30

Fig. 10 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Tests zur Zersetzung von TCE im Vergleich zwischen immobilisierten Bakterienzellen und freien Bakterienzellen gemäß Ausführungsform 7 zeigt;

Fig. 11 ein Diagramm, das den Zustand der Zersetzung von organischen Verbindungen in Ausführungsform 8 zeigt;

Fig. 12 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Zersetzung verschiedener Arten organischer Verbindungen unter Verwendung des Stamms YMCT-001 in Ausführungsform 8 zeigt; 35

Fig. 13 ein Diagramm, das den Zustand der Zersetzung der organischen Verbindungen in Ausführungsform 9 zeigt;

Fig. 14 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Zersetzung verschiedener Arten organischer Verbindungen unter Verwendung des Stamms YMCT-001 in Ausführungsform 9 zeigt; 40

Fig. 15 ein Diagramm, das den Zustand der Zersetzung der organischen Verbindungen in Ausführungsform 10 zeigt;

Fig. 16 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Zersetzung verschiedener Arten organischer Verbindungen unter Verwendung des Stamms YMCT-001 in Ausführungsform 10 zeigt;

Fig. 17 ein Diagramm, das den Zustand der Zersetzung der organischen Verbindungen in Ausführungsform 11 zeigt; 45

Fig. 18 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Zersetzung verschiedener Arten organischer Verbindungen unter Verwendung des Stamms YMCT-001 in Ausführungsform 11 zeigt;

Fig. 19 ein Diagramm, das den Zustand der Zersetzung der organischen Verbindungen in Ausführungsform 12 zeigt; 50

Fig. 20 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Zersetzung verschiedener Arten organischer Verbindungen unter Verwendung des Stamms YMCT-001 in Ausführungsform 12 zeigt;

Fig. 21 ein Diagramm, das den Zustand der Zersetzung der organischen Verbindungen in Ausführungsform 13 zeigt; 55

Fig. 22 ein Diagramm, das die Ergebnisse der Zersetzung verschiedener Arten organischer Verbindungen unter Verwendung des Stamms YMCT-001 in Ausführungsform 13 zeigt.

Die Erfindung wird nun nachfolgend weiter im Detail unter Bezugnahme auf die bevorzugten Ausführungsformen beschrieben.

Das Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung macht grundsätzlich Gebrauch von einem Mikroorganismus, der ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen hat und der von der Umgebung, die mit organischen Verbindungen kontaminiert ist, oder einer Probe abgeleitet ist, die mit der kontaminierten Umgebung in Kontakt steht. Eine Ausführungsform des Verfahrens zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung wird nachfolgend im einzelnen unter Bezugnahme auf Fig. 1 beschrieben. 60

Zuerst werden Proben (kontaminierte Umgebung) von der Umgebung entnommen, die durch organische Verbindungen kontaminiert ist (101 in Fig. 1). Die kontaminierte Umgebung, von der die Proben gewonnen werden, ist irgendeine durch organische Verbindungen kontaminierte Umgebung und ist nicht in besonderer Weise beschränkt. Beispielsweise kann dies kontaminiertes Erdreich, kontaminiertes Grundwasser oder konta- 65

miniertes Flußwasser sein. Die organischen Verbindungen, die als kontaminierende Substanzen angesprochen sind, sind nicht in besonderer Weise beschränkt und können beispielsweise TCE, cis-DCE, trans-DCE oder 1,1-DCE sein.

Im nächsten Schritt werden Mikroorganismen, die ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, von der gewonnen kontaminierten Umgebung oder den mit der kontaminierten Umgebung in Kontakt stehenden Proben isoliert (102 in Fig. 1). Von den Mikroorganismen, die in Gegenwart der organischen Verbindungen wachsen, die in der gewonnen Probe der kontaminierten Umgebung vorhanden sind, wird ein Mikroorganismus selektiert, der ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist. So kann in effizienter Weise ein Mikroorganismus isoliert werden, der tolerant gegenüber den organischen Verbindungen ist und in Gegenwart der organischen Verbindungen als Kohlenstoff-Quelle wachsen kann. Mit anderen Worten: Ein Mikroorganismus, der gegen organische Verbindungen tolerant ist und der ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, kann in effizienter Weise isoliert werden. Der Mikroorganismus, der wie oben beschrieben isoliert wurde, zeigt ein stabiles Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen, das vorzugsweise so ausgestaltet ist, daß der Mikroorganismus keine weiteren Zusätze oder induzierenden Substanzen in dem Verfahren zum Zersetzen der organischen Verbindungen benötigt, wie es nachfolgend beschrieben wird, so daß eine stabile und effiziente Zersetzung der organischen Verbindungen in einfacher Weise aufrechterhalten werden kann.

Der organische Verbindungen abbauende Mikroorganismus kann irgendein Mikroorganismus einer bestimmten Art sein, die durch das oben beschriebene Verfahren der Isolation des Mikroorganismus erhalten werden kann, wie es nachfolgend im einzelnen beschrieben wird. Der Mikroorganismus ist nicht auf spezielle Mikroorganismen beschränkt. Beispielsweise liegen im Rahmen der vorliegenden Erfindung Bakterien, die zu den Genus *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Actinomyces*, *Amycolota*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Gordona*, *Komagatella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pimelobacter*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* und *Terranacter* gehören. Tabelle 1 zeigt typische Bakterien der oben genannten Genus. Im Hinblick auf die Bakterien der Familie *Micrococcus* offenbart die japanische offengelegte Patentveröffentlichung Nr. Hei 7-96,289 die Verwendung von Bakterien der Genus *Micrococcus* und *Staphylococcus*; es wurde jedoch angegeben, daß alle Spezies der Bakterien, die zu den vorstehend genannten Genus gehören, nicht immer ein gutes Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen in tatsächlich vorkommenden kontaminierten Umgebungsbereichen zeigen.

Die Umgebung, die in der Praxis eine Reinigung benötigt, weist allgemein einen pH-Wert von 4 bis 10 als erste Bedingung, eine Temperatur von 277 bis 313 K als zweite Bedingung zusätzlich zu der ersten Bedingung und eine Konzentration an organischen Verbindungen von 30 ppb bis 500 ppm als dritte Bedingung zusätzlich zur ersten und zweiten Bedingung auf. Wenn Mikroorganismen in der vorstehend beschriebenen Umgebung nicht leben und sich vermehren können, das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen nicht über eine längere Zeit aufrechterhalten können oder organische Verbindungen nicht in kürzerem Zeitraum zersetzen können, können sie nicht zum Zersetzen organischer Verbindungen in der Weise verwendet werden, daß sie in kontaminiertem Erdreich oder kontaminiertem Grundwasser belassen, mit diesem in Kontakt gebracht oder auf dieses gesprüht werden, in einen Behälter gefüllt und vergraben werden oder auf einem Träger fixiert und aufgesprüht werden.

Bei den Mikroorganismen, die durch ein Kultivierungsverfahren und ein Verfahren zum Selektieren der Mikroorganismen, die gegenüber organischen Verbindungen tolerant sind, in dem Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten wurden, wurde im Rahmen der Erfindung das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen, insbesondere das Vermögen zum Zersetzen von TCE, der Bakterien unter den oben beschriebenen, in kontaminierten Umgebungsbereichen vorkommenden Bedingungen bewertet. Als Ergebnis wurde gefunden, daß die Bakterien, die zum Zersetzen organischer Verbindungen unter der ersten und der zweiten Bedingung verwendbar sind, Spezies sind, denen die Symbole Δ, O und @ in Bezug auf ihr Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen gegeben wurde, wie dies in der folgenden Tabelle 1 gezeigt ist. Um auch die dritte Bedingung zu erfüllen, müssen den Spezies die Symbole O und @ gegeben werden. Die Spezies, denen das Symbol @ gegeben wurde, sind am meisten bevorzugt, da sie organische Verbindungen in kürzerer Zeit (90% oder mehr ist in 5 Tagen zersetzt) zersetzen können. Es wird angenommen, daß diese Bakterien einige Oxidasen in ihrem Zellkörper aufweisen (z. B. Methanmonooxygenase, Toluolmonooxygenase, Ammoniakoxidase oder dergleichen) oder solche Oxidasen aus dem Zellkörper abgeben. Derartige Enzyme stehen mit der Zersetzung organischer Verbindungen in Beziehung.

Tabelle 1

Genus	Spezies	Vermögen zum Zersetzen von TCE
Actinomyces	A. bovis	Δ
Amycolota	A. autotrophica	○
Arthrobacter	A. globiformis	@
Brevibacter	B. globiformis	@
Clavibacter	C. michiganensis	@
Corynebacterium	C. diphtheriae	Δ
Gordona	G. bronchialis	Δ
Komagatella	K. brevis	@
Micrococcus	M. agilis	○
	M. halobius	○
	M. kristinae	○
	M. luteus	Δ (-)
	M. lylae	○
	M. nishinomiyaensis	○
	M. roseus	○
	M. sedentarius	○
	M. varians	○
Mycobacterium	M. tuberculosis	@
Nocardia	N. asteroides	○
Pimelobacter	P. simplex	○
Planococcus	P. citreus	○
	P. kocurii	○
Renibacterium	R. salmoninarum	@
Rhodococcus	R. rhodochrous	○

Genus	Spezies	Vermögen zum Zersetzen von TCE
Staphylococcus	<i>S. aristtae</i>	○
	<i>S. aureus</i>	Δ (-)
	<i>S. auricularis</i>	○
	<i>S. calptis</i>	○
	<i>S. caprae</i>	○
	<i>S. carnosus</i>	○
	<i>S. caseoticus</i>	○
	<i>S. chromogenes</i>	○
	<i>S. cohnii</i>	Δ
	<i>S. delphini</i>	○
	<i>S. epidermidis</i>	○
	<i>S. equorum</i>	○
	<i>S. felis</i>	○
	<i>S. gallinarum</i>	○
	<i>S. haemolyticus</i>	Δ
	<i>S. hominis</i>	○
	<i>S. hyicus</i>	○
	<i>S. intermedius</i>	○
	<i>S. kloosii</i>	○
	<i>S. lentus</i>	○
	<i>S. lugdunensis</i>	X
	<i>S. saccharolyticus</i>	○
	<i>S. saprophyticus</i>	○
	<i>S. schleiferi</i>	○
	<i>S. sciuri</i>	○
	<i>S. simulans</i>	Δ
	<i>S. warnneri</i>	○

Genus	Spezies	Vermögen zum Zersetzen von TCE
	<i>S. xylosus</i>	○
<i>Stomatococcus</i>	<i>S. mucilaginosus</i>	○
<i>Terrabacter</i>	<i>T. tumescens</i>	@

Anmerkungen:

Vermögen zum Zersetzen von TCE (1 ppm, 5 Tage, 293 K):

@: nicht weniger als 90 %;

○: nicht weniger als 75 %;

△: nicht weniger als 40 %;

X: weniger als 10 %.

Es folgt nun eine detaillierte Beschreibung eines Verfahrens zum Isolieren von Mikroorganismen, die das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, unter Anwendung auf die oben beschriebenen Bakterien als Beispiele.

Zuerst werden Mikroorganismen, die von der kontaminierten Umgebung gewonnen werden, mit einer geeigneten Mengen zugesetzter organischer Verbindungen kultiviert (102-1 in Fig. 1). Mikroorganismen (tolerante Bakterien), die tolerant gegenüber einem hohen Konzentrationswert der organischen Verbindungen sind, werden aus der Kultur selektiert (102-2 in Fig. 1). Außerdem konnten die tatsächlich existierenden Bedingungen in Bezug auf die organische Verbindung auf denselben Wert eingestellt werden wie in den Umgebungsbereichen, von denen die Bakterien gewonnen worden waren.

Ein Beispiel der Selektion der toleranten Bakterien wird nachfolgend gezeigt. Das anorganische Salze umfassende Kulturmedium, das in dem folgenden Fall verwendet wurde (einschließlich der Ausführungsformen, die nachfolgend zu beschreiben sind), weist die folgenden Komponenten auf. Das Kulturmedium wird je nach den physiologischen Erfordernissen der Mikroorganismen, die extrahiert werden sollen, geändert und ist nicht auf das folgende, beispielhafte Kulturmedium mit anorganischen Salzen beschränkt.

Komponenten des anorganische Salze umfassenden Kulturmediums (in 1 l des anorganische Salze umfassenden Kulturmediums):

Na ₂ HPO ₄	9,8 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MgO	10,75 mg
CaCO ₃	2,0 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,44 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,95 mg
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,28 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25 mg
H ₃ BO ₃	0,06 mg
Starke Chlorwasserstoffsäure	51,3 µl

Zuerst wird Grundwasser oder Erdreich, das beispielsweise mit TCE in hoher Konzentration kontaminiert ist, gewonnen. Das Grundwasser selbst (oder im Fall von Erdreich: dessen Extrakt) wird auf einem anorganische Salze umfassenden Agar-Kulturmedium inokuliert oder wird zu 0,1 ml eines 0,1 M Phosphat-Puffers und 0,5 ml Top-Agar gegeben und schichtmäßig auf einem anorganische Salze umfassenden Agar-Kulturmedium in einem dicht verschlossenen Behälter angeordnet. Der Extrakt ist eine wäßrige Lösung, die hergestellt wurde durch Eingeben von 1 g Erdreich und 9 g destillierten Wassers in ein sterilisiertes Glasfläschen, Mischen der Komponenten in dem Fläschen und Behandeln der Mischung mit Ultraschall-Wellen oder durch sorgfältiges Schütteln. Der Top-Agar wird schichtmäßig darauf angeordnet. Nachdem dieser fest geworden ist, wird beispielsweise eine TCE enthaltene Acetonitril-Lösung zugegeben, und der Behälter wird dicht verschlossen. Der Behälter wird in einen Inkubator gestellt, der auf eine Temperatur von 289 K eingestellt wurde, und es erfolgt ein Kultivieren für etwa 5 bis 10 Tage. Während dieser Zeit wird die organische Verbindung, z. B. TCE, zugesetzt, um die

Konzentration der organischen Verbindungen in der Gasphase in dem geschlossenen Behälter auf beispielsweise 50 bis 10.000 ppm einzustellen. Anschließend wird eine auf dem Agar-Medium oder dem Top-Agar auftretende Kolonie mit einer Platin-Schleife selektiert und so eine Probe von gegen organische Verbindungen toleranten Bakterien erhalten.

5 Anschließend werden Mikroorganismen (organische Verbindungen zersetzende Bakterien), die das Vermögen aufweisen, organische Verbindungen zu zersetzen, von den oben beschriebenen, gegen organische Verbindungen toleranten Bakterien selektiert (102-3 in Fig. 1). Ein Beispiel des Selektierens von Bakterien, die das Vermögen aufweisen, organische Verbindungen zu selektieren, wird nachfolgend beschrieben.

Die gegenüber organischen Verbindungen toleranten, selektierten Bakterien werden auf einem flüssigen LB-Kulturmedium inokuliert und in einer Schüttelkultur über Nacht unter Bedingungen von beispielsweise 298 K und 100 Upm unter Herstellung von Bakteriensuspensionen vorkultiviert. Anschließend werden Bakterienzellen aus 100 µl der Bakteriensuspension ($OD_{600} = 1$) und 25 ml eines anorganische Salze umfassenden Kulturmediums in ein Glasfläschchen gegeben, und organische Verbindungen, z. B. TCE und cis-DCE, werden in einer Menge von jeweils 1 ppm zugesetzt. Das Glasfläschchen wird dicht mit einer mit Teflon beschichteten Butylkautschuk-Kappe und einem Aluminiumkappen-Verschluß verschlossen, und eine Schüttelkultur wird unter Bedingungen von 298 K und 100 Upm durchgeführt. Es wird eine Zersetzung der organischen Verbindungen beobachtet, und gegen organische Verbindungen tolerante Bakterien, die das Vermögen zur Zersetzung von organischen Verbindungen aufweisen, werden selektiert. So werden Bakterien erhalten, die eine Toleranz gegenüber organischen Verbindungen aufweisen und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen haben. Die Konzentration an organischen Verbindungen wird nach dem Kopfraum-Verfahren unter Verwendung eines Gaschromatographen gemessen und so die Rate der Zersetzung der organischen Verbindungen berechnet. Fig. 2 zeigt ein Beispiel der Ergebnisse der Zersetzungstests der organischen Verbindungen durch die gegenüber organischen Verbindungen toleranten Bakterien.

Da im Rahmen des oben beschriebenen Verfahrens der Isolierung von Mikroorganismen, die das Vermögen zur Zersetzung organischer Verbindungen aufweisen, Mikroorganismen, z. B. Bakterien, in der kontaminierten Umgebung einer Atmosphäre kultiviert werden, die eine hohe Konzentration organischer Verbindungen an einem Punkt enthält, kann die Zahl von Bakterien reduziert werden, so daß die gegenüber organischen Verbindungen toleranten Bakterien effizient selektiert werden können. Derzeit können verschiedene Arten organischer Verbindungen als die organischen Verbindungen verwendet werden. Wenn jedoch die organischen Verbindungen, die in der Umgebung zugegen sind, von der die Mikroorganismen gewonnen wurden, verwendet werden, können in einfacher Weise Mikroorganismen (z. B. Bakterien), die gegenüber den organischen Verbindungen tolerant sind, in einfacher Weise selektiert werden. Außerdem können durch Kultivieren unter solchen Bedingungen, daß TCE oder dergleichen zugesetzt wird, um die Konzentration in der Gasphase auf einen Wert im Bereich von 50 bis 10.000 ppm einzustellen, Mikroorganismen in sehr effizienter Weise selektiert werden, die eine höhere Toleranz aufweisen und die mit den organischen Verbindungen wie beispielsweise TCE als alleinige Kohlenstoff-Quelle gezüchtet werden können. Wenn die organischen Verbindungen wie beispielsweise TCE eine Gasphasen-Konzentration von weniger als 50 ppm aufweisen, steigt die Zahl lebender Bakterien nach dem Kultivieren an, sinkt die Effizienz des Selektierens der gegenüber den organischen Verbindungen toleranten Bakterien, und die erhaltenen toleranten Bakterien können eine unzureichende Toleranz gegenüber den organischen Verbindungen aufweisen. Wenn andererseits die organischen Verbindungen wie beispielsweise TCE eine Konzentration in der Gasphase von mehr als 10.000 ppm aufweisen, erniedrigt sich die Effizienz der Selektion der toleranten Bakterien. Außerdem ist die Effizienz des Isolierens von Bakterien, die das Vermögen zur Zersetzung organischer Verbindungen aufweisen, 1/38 aller Kolonien, die auftraten, wenn die organischen Verbindungen wie beispielsweise TCE eine Gasphasen-Konzentration im Bereich von 50 bis 100 ppm aufweisen, ist 1/4 aller Kolonien, die auftraten, wenn die Gasphasen-Konzentration in einem Bereich von 100 bis 400 ppm liegt, ist 1/1 aller Kolonien, die auftraten, wenn die Gasphasen-Konzentration im Bereich von 4.000 bis 8.000 ppm liegt, und ist 1/2 aller Kolonien, die auftraten, wenn die Gasphasen-Konzentration im Bereich von 8.000 bis 10.000 ppm liegt. So können Bakterien, die das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, in einem hohen Verhältnis isoliert werden. Daher liegt die Gasphasen-Konzentration der organischen Verbindungen, beispielsweise TCE, beim Kultivieren noch mehr bevorzugt in einem Bereich von 4.000 bis 8.000 ppm.

50 In dem Verfahren zum Isolieren von Mikroorganismen, die das Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, zum Kultivieren der Mikroorganismen, die aus der kontaminierten Umgebung unter den Bedingungen gewonnen wurden, daß die organischen Verbindungen in einer hohen Konzentration zugegen sind, werden die Mikroorganismen, die in der Probe enthalten sind, in einer passenden Menge auf einem festen Kulturmedium mittels einer Platinschleife oder dergleichen inokuliert und unter solchen Bedingungen kultiviert, daß die Gasphasen-Konzentration der organischen Verbindung(en) in einem Bereich von 50 bis 10.000 ppm liegt. Dabei werden die Mikroorganismen-Kolonien mit den organischen Verbindungen direkt in der Atmosphäre (Gasphase) in Kontakt gebracht, da die Mikroorganismen, die gegenüber den organischen Verbindungen tolerant sind, oft Kolonien auf dem festen Kulturmedium ausbilden. Durch In-Kontakt-Bringen der Mikroorganismen-Kolonien mit den organischen Verbindungen, die eine Gasphasen-Konzentration im Bereich von 50 bis 60 10.000 ppm in der Atmosphäre (Gasphase) aufweisen, können die Mikroorganismen, die möglicherweise ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, effizient und einfach selektiert werden, so daß reine Kulturen der Mikroorganismen in einfacher Weise mit den selektierten Kolonien gebildet werden können, wie dies erforderlich ist. Daher können die Mikroorganismen, die ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, schnell und sicher isoliert werden. Wenn die aus der kontaminierten Umgebung gewonnenen Mikroorganismen unter solchen Bedingungen kultiviert werden, daß die organischen Verbindungen in hoher Konzentration zugegen sind, können die anderen Bedingungen des Kulturmediums wie z. B. der pH-Wert und die Temperatur der Kultur je nach den Erfordernissen geändert werden, und die für die Mikroor-

ganismen erforderlichen Eigenschaften, z. B. die Komponenten im Kulturmedium sowie der pH Wert und die Temperatur der Kultur, werden nach den Wachstumsbedingungen g mäß den Erfordernissen geändert, so daß Mikroorganismen, die gewünschte Eigenschaften aufweisen (z. B. Wachstumsbedingungen), in einfacher Weise isoliert werden können. Was das Kulturmedium zum Kultivieren der Mikroorganismen angeht, ist es erwünscht, ein Kulturmedium zu verwenden, z. B. ein festes Kulturmedium oder dergleichen, in dem die Mikroorganismen Kolonien ausbilden können. 5

Außerdem können durch Selektieren der Mikroorganismen (z. B. der oben beschriebenen, organische Verbindungen zersetzenden Bakterien), die ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, aus den Mikroorganismen (z. B. aus den oben beschriebenen, gegenüber organischen Verbindungen toleranten Bakterien), die allein auf der Basis ihrer Toleranz gegenüber organischen Verbindungen als Index selektiert wurden, die Mikroorganismen, die mit den organischen Verbindungen als einzige Kohlenstoff-Quelle gezüchtet werden können und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, in effizienter Weise isoliert werden. Mit anderen Worten: Die Mikroorganismen, die organische Verbindungen zersetzen, ohne daß sie dazu irgendeinen Zusatz oder eine induzierende Substanz benötigen und eine gute Stabilität in dem Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen, können in effizienter Weise erhalten werden. Zum Selektieren der Mikroorganismen zum Zersetzen der organischen Verbindungen aus den Mikroorganismen, die tolerant gegenüber den organischen Verbindungen sind, wird das Selektionsverfahren durchgeführt, indem man verschiedene Arten organischer Verbindungen gemäß der Anwendung verwendet, so daß die Mikroorganismen, z. B. Bakterien, die ein Vermögen zum Zersetzen verschiedener Arten organischer Verbindungen aufweisen, leicht erhalten werden können. Die Mikroorganismen können solche sein, die ein Vermögen zum Zersetzen einer einzigen Art organischer Verbindungen gemäß der Anwendungsweise aufweisen. Es sind jedoch Mikroorganismen, die ein Vermögen zum Zersetzen verschiedener Arten organischer Verbindungen aufweisen, aus praktischer Sicht in hohem Maße erwünscht, wenn sie zum Reinigen der Umgebung verwendet werden. 10 15 20

Der oben beschriebene Prozeß ist äquivalent zu dem Verfahren zum Isolieren von Mikroorganismen gemäß der vorliegenden Erfindung. Der neue Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung, nämlich YMCT-001 (hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer "FERM BP-5282" beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology), der eines der Bakterien ist, die als *Komagatella brevis* klassifiziert wurden, die ein Vermögen zum Zersetzen chlorierter organischer Verbindungen aufweisen, ist einer der Mikroorganismen, die durch das Verfahren zum Extrahieren eines Mikroorganismus erhalten wurde, das auf dem Beispiel des Selektierens von Mikroorganismen, die gegenüber den oben beschriebenen organischen Verbindungen tolerant sind, und des Selektierungsbeispiels von Mikroorganismen basiert, die die oben beschriebenen organischen Verbindungen zersetzen. Der Stamm YMCT-001 wird später im Detail beschrieben. 25 30

Anschließend werden die Mikroorganismen, z. B. die Bakterien, die in dem obigen Verfahren zum Isolieren der Mikroorganismen, die ein Vermögen zur Zersetzung von organischen Verbindungen aufweisen, erhalten wurden, tolerant gegenüber den organischen Verbindungen sind und das Vermögen zum Zersetzen von organischen Verbindungen aufweisen, mit den zu zersetzenden organischen Verbindungen in Kontakt gebracht, um einen biologischen Abbau der organischen Verbindungen zu bewirken (103 in Fig. 1). Dieser biologische Abbau-Prozeß kann auf eine Bioabbau-Behandlung verschiedener Arten organischer Verbindungen angewendet werden, wie beispielsweise die Zersetzung organischer Verbindungen (einschließlich in Abwasser oder Abgas, das organische Verbindungen enthält) als Abfällen oder die Reinigung von Umgebungsbereichen, die durch organische Verbindungen kontaminiert sind. 35 40

Der vorstehend beschriebene Prozeß des biologischen Abbaus organischer Verbindungen kann zur effizienten biologischen Zersetzung organischer Verbindungen führen, ohne daß dafür ein Additiv oder eine induzierende Substanz erforderlich ist. Der Prozeß macht Gebrauch von Mikroorganismen (z. B. Bakterien), die aus der kontaminierten Umgebung isoliert werden, so daß die Vorgehensweise frei ist davon, eine Sekundär-Kontamination dadurch hervorzurufen, daß ein Additiv oder eine induzierende Substanz zugeführt werden muß, die für die Umgebung gefährlich ist, oder dadurch, daß die Mikroorganismen aufgesprüht werden. Darüber hinaus kann deswegen, weil kein Additiv oder keine induzierende Substanz erforderlich ist, der biologische Abbau der organischen Verbindungen in einfacher Weise aufrecht erhalten werden. Daher ist dieses Verfahren besonders wirksam zur Reinigung der kontaminierten Umwelt. Wenn beispielsweise organische Verbindungen als Teil des Reinigens der Umwelt biologisch zersetzt werden, können die zu zersetzenden organischen Verbindungen dadurch zersetzt werden, daß man sie mit den Mikroorganismen (z. B. mit den Bakterien) in der kontaminierten Umwelt, die die organischen Verbindungen enthält, in Kontakt bringt. Dadurch kann die kontaminierte Umgebung in wirksamer Weise gereinigt werden, wobei die Belastung der Umwelt so weit wie möglich abgesenkt wird. Die zu reinigende belastete Umwelt schließt Erdreich, Grundwasser und Flußwasser ein, wie dies bereits oben beschrieben wurde. 45 50 55

Die einen biologischen Abbau zu unterziehenden organischen Verbindungen schließen ein: TCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten, Dichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertes Biphenyl, wie dies bereits oben beschrieben wurde. Die zersetzenden Bakterien können in geeigneter Weise in Abhängigkeit von den organischen Verbindungen, die einem biologischen Abbau unterworfen werden sollen, gewählt bzw. selektiert werden. Insbesondere weist der Stamm YMCT-001 gemäß der Erfindung das Vermögen zur Zersetzung irgendeiner der oben beschriebenen organischen Verbindungen auf und kann in breiter Weise verwendet werden, was ihn im praktischen Gebrauch überlegen macht. 60 65

Es erfolgt nun anschließend eine Beschreibung des zum Genus *Komagatella* gehörenden Bakteriums, das einer der Mikroorganismen ist, der durch das oben beschriebene Isolationsverfahren von Mikroorganismen, die

Toleranz gegenüber organischen Verbindungen aufweisen, und den Mikroorganismen-Isolationsprozeß auf der Basis der Selektion der Mikroorganismen zum Zersetzen der organischen Verbindungen erhalten wurde, insbesondere der Stamm (nachfolgend bezeichnet als Stamm YMCT-001), der ein Beispiel für Bakterien der Art *Komagatella brevis* ist, nämlich der neue Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung.

5 Der Stamm YMCT-001 weist die folgenden bakteriologischen Eigenschaften auf:

(a) Morphologische Eigenschaften usw.

(1) Zellform- und Größe:

— Nähragar-Kulturmedium:

10 kurze Stäbchen (0,9 bis 1,1 auf 1,5 bis 1,8 µm) werden gebildet, wenn die Kultivierung bei 30°C über 6 h erfolgte.

Kokkenartige kurze Stäbchen (1,0 bis 1,2 auf 1,2 bis 1,3 µm) werden gebildet, wenn die Kultivierung bei 30°C für die Zeit von 24 h erfolgte.

— Nährbrühe-Kulturmedium:

15 Es wurde kein Wachstum beobachtet, wenn die Kultivierung bei 30°C für die Zeit von 6 h erfolgte.

Kokkenartige kurze Stäbchen (1,0 bis 1,2 auf 1,1 bis 1,3 µm) wurden gebildet, wenn ein Kultivieren bei 30°C über 24 h erfolgte.

(2) Polymorphismus: wurde beobachtet;

Stäbchen-Kokken-Zyklus wurde beobachtet (jedoch nicht klar).

20 (3) Beweglichkeit: —

(4) Sporen: —

(5) Verlängerung der Zellrand-Kolonie: —

(b) Kultureigenschaften

25 (1) Nähragar-Plattenkultur: Kolonien sind glatt, haben wellenartige Kanten und sind leicht glänzend;

Pigmente oder diffundierbare Pigmente werden nicht produziert.

(2) Nährbrühen-Kultur: Wachstum im gesamten Kulturmedium und geringe Menge an Niederschlag beobachtet; Bildung eines Oberflächenfilms nicht beobachtet.

30 (3) Nährgelatine-Einstichkultur: Wachstum auf dem oberen Teil beobachtet; Verflüssigung nicht beobachtet.

(4) Lackmus-Milch: Wachstum nicht beobachtet.

(c) Physiologische Eigenschaften:

35 (1) Gram-Anfärbbarkeit: +

(2) Nitrat-Reduktion: +

(3) Nitrit-Reduktion: —

(4) Denitrifizierungsreaktion: —

(5) MR-Test: —

40 (6) VP-Test: —

(7) Indoltest: —

(8) Hydrogensulfid-Produktion:

TSI-Agar: —

Flüssiges Bleiacetat-Kulturmedium: —

45 (9) Stärkehydrolyse: —

(10) Verwendung von Citronensäure:

Kosers Kultur-Medium: gering

Christensens Kultur-Medium: +

(11) Nutzung anorganischer Stickstoff-Quellen:

Nitrat: —

50 Ammoniumsalze: +

(12) Pigmentbildung: —

(13) Urease: —

(14) Oxidase: —

(15) Katalase: +

55 (16) Bereich für das Wachstum:

pH: 6,0 bis 8,5 (Optimum: 7,0 bis 8,5)

Temperatur: 4 bis 39°C (Optimum 20 bis 27°C)

(17) Aerobes Wachstum: +

(18) O-F-Test: —

60 (19) Säure aus

L-Arabinose: —

D-Xylose: —

D-Glucose: —

D-Mannose: —

65 D-Fructose: —

D-Galactose: —

Maltose: —

Sucrose: —

Lactose: —	
Trehalose: —	
D-Sorbitol: —	
D-Mannitol: —	
Inositol: —	5
Glycerin: —	
Stärke: —	
Raffinose: —	
Saccharose: —	
Cellobiose: —	10
Mannit: —	
(20) Gas aus	
L-Arabinose: —	
D-Xylose: —	
D-Glucose: —	15
D-Mannose: —	
D-Fructose: —	
D-Galactose: —	
Maltose: —	
Sucrose: —	20
Lactose: —	
Trehalose: —	
D-Sorbitol: —	
D-Mannitol: —	
Inositol: —	25
Glycerin: —	
Stärke: —	
(d) Andere physiologische Eigenschaften:	
(1) Arginin-Hydrolyse: —	30
(2) Aesculin-Hydrolyse: —	
(3) Tween80-Hydrolyse: +	
(4) DNase: —	
(5) Gelatine-Hydrolyse: —	
(6) Säurebeständigkeit: —	35
(e) Chemisch-taxonomische Eigenschaften:	
(1) G + C der DNA: 72 Mol%	
(2) Diaminosäure der Zellwand: meso-Diaminopimelinsäure	
(3) Arabinogalactan-Polymer der Zellwand: —	40
(4) Glycolyl-Test: —	
(5) Art des Zell-Lipids:	
Mycolinsäure: — auf Chinon Basis: MK-8 (H ₄).	

Im Hinblick auf die oben beschriebenen bakteriologischen Eigenschaften und nach weiterer Suche bzw. Recherche in den Werken "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 2 (1986)" und "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994)" wurde der Stamm YMCT-001 als *Corynebacterium* identifiziert, das keine Sporen bildet, ein grampositiver Bazillus ist, der Polymorphismus in Bezug auf seine Zellform zeigt und in weitem Umfang in der natürlichen Umgebung existiert, beispielsweise im Erdreich.

Jedoch unterscheidet sich der Stamm YMCT-001 in seinen Eigenschaften von allen anderen Stämmen, die in den oben angegebenen Druckschriften erwähnt sind, so daß die taxonomische Stellung des Stamms YMCT-001 nicht bestimmt werden konnte.

Um eine Klassifizierung im Hinblick auf die genetischen Eigenschaften vorzunehmen, wurde die Nucleotidsequenz der 16S rRNA des Stamms YMCT-001 bestimmt, und die oben angegebenen bakteriologischen Eigenschaften wurden dabei berücksichtigt. Die Nucleotidsequenz der 16S rRNA des Stamms YMCT-001 wurde mit der Nucleotidsequenz der 16S rRNA von Bakterien verglichen, von denen in Betracht gezogen wurde, daß sie mit dem Stamm YMCT-001 in Beziehung stehen. Darüber hinaus wurde ein molekulargenealogischer Baum nach dem NJ-Verfahren unter Verwendung von "Gene Works (Teihin System Technology Kabushiki Kaisha)" erstellt. Fig. 3 zeigt den erhaltenen molekulargenealogischen Baum.

Wie aus Fig. 3 ersichtlich, wurde gefunden, daß der Stamm YMCT-001 sehr nahe verwandt mit Bakterien ist, die zum Genus *Terrabacter* gehören. Dies beruhte auf einer Analyse eines Gens. Es wurde jedoch nach Untersuchen der evolutionären Entfernung vorgeschlagen, daß der Stamm YMCT-001 nahe verwandt mit *Terrabacter* ist, jedoch ein Bakterium ist, das zu einem davon verschiedenen Genus gehört. In Fig. 3 ist die Länge des Asts der molekulargenealogischen Baums proportional zur wahrscheinlichen Zahl der ersetzten Basen, und die Balkenskala gibt eine evolutionäre Entfernung an. Bei Untersuchung im Hinblick auf die bakteriologischen Eigenschaften des Stamms YMCT-001 und den zum Genus *Terrabacter* gehörenden Bakterien wurde gefunden, daß die Diaminosäure der Zellwand meso-Diaminopimelinsäure beim Stamm YMCT-001 war, während die Diaminosäure der Zellwand bei den Genus *Terrabacter* gehörenden Bakterien LL-Diaminopimelinsäure war.

Dies ergibt sich aus dem Punkt (e) der obigen Liste (Chemisch taxonomische Eigenschaften). Diese Tatsache führt dazu, daß die Arten der Diaminosäuren der Zellwandung verschieden sind. Die Art der Diaminosäure der Zellwandung ist einer der Indices für die taxonomische Klassifizierung des Genus. Daher wurde im Rahmen der Erfindung im Hinblick auf die evolutionäre Entfernung des Stamms YMCT-001 von dem Genus Terrabacter und von den bakteriologischen Eigenschaften des Stamms YMCT-001 geschlossen, daß der Stamm YMCT-001 als neue Spezies zu klassifizieren sei, die in sehr naher Beziehung zu Terrabacter steht. Man kam zu dem Schluß, daß der Stamm YMCT-001 eine neue Bakterienart ist, die zu einem neuen Genus gehört. Dieser wurde mit *Komagatella brevis* bezeichnet.

Dementsprechend wurden die bakteriologischen Eigenschaften von *Komagatella brevis* und anderen Bakterien im Hinblick auf die genetische Entfernung untersucht. Bakterien mit relativ geringer genetischer Entfernung wurden daraufhin untersucht, ob sie dieselben Eigenschaften aufweisen wie *Komagatella brevis* oder nicht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der oben angegebenen Tabelle 1 gezeigt. Aus dieser Tabelle ist offensichtlich, daß diese Bakterien dieselben Eigenschaften aufweisen wie Bakterien der Genus *Arthrobacter*, *Brevibacter*, *Clavibacter*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Terrabacter* und *Komagatella*. Fig. 3 zeigt die genetischen Entfernungen der oben angegebenen Genus von *Komagatella*.

Was die Kultivierung des Stamms YMCT-001 angeht, so kann dieser bei einer Temperatur von 277 K bis 313 K gezüchtet werden. Die Kultivierungstemperatur liegt jedoch vorzugsweise bei 283 bis 303 K und am meisten bevorzugt bei 288 bis 298 K. Das Kulturmedium weist einen pH-Wert von 6,0 bis 9,5 und vorzugsweise von 6,5 bis 9,0 auf. Der am meisten geeignete pH-Wert des Kulturmediums für das Kultivieren liegt bei 7,5 bis 8,5. Das Kulturmedium zum Züchten des Stamms YMCT-001 kann ein LB-Kulturmedium, ein NB-Kulturmedium oder dergleichen für das allgemeine Züchten von Bakterien sein, genauso gut jedoch auch eines von verschiedenen Arten von anorganische Salze umfassenden Kulturmedien.

Der Stamm YMCT-001 kann gezüchtet werden mit TCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE oder dergleichen als einziger Kohlenstoff-Quelle. Das Bakterium weist das Vermögen zum Zersetzen verschiedener Arten organischer Verbindungen auf, beispielsweise Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten, Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertes Biphenyl. Daher kann der Stamm YMCT-001 in wirksamer und extensiver Weise für die Reinigung und für Zersetzungsbehandlungen von Umgebungsbereichen, die durch organische Verbindungen kontaminiert sind, durch Mikroorganismen verwendet werden und ist im Bereich der praktischen Anwendung überlegen. Bei Einsetzen des Stamms YMCT-001 in einem Bioreaktor und Einstellen der Anzahl der Bakterien können organische Verbindungen in höherer Konzentration noch effizienter zersetzt werden. Da der Stamm YMCT-001 in zufriedenstellender Weise organische Verbindungen bei einem pH-Wert von 6,0 bis 8,5 und bei einer Temperatur von 283 bis 303 K unter Anwendung des Stamms YMCT-001 auf den Bioreaktor zersetzt, ist es bevorzugt, das Bakterienbett in dem Bioreaktor auf einen pH-Wert von 6,0 bis 8,5 und eine Temperatur von 283 bis 303 K einzusteuern.

Spezielle Ausführungsformen der Erfindung werden nachfolgend beschrieben.

Ausführungsform 1

Zuerst wurden 25 ml des oben beschriebenen, anorganische Salze umfassenden Kulturmediums und Bakterienzellen aus 100 µl ($OD_{660} = 1,0$) eines flüssigen LB-Kulturmediums für den Stamm YMCT-001 in ein Glasfläschchen gegeben. Von diesem Glasfläschchen wurden mehrere vorbereitet. TCE, cis-DCE und trans-DCE wurden in einer Konzentration von 1 ppm in die jeweiligen Glasfläschchen gegeben. Diese wurden einer Schüttelkultur unter Bedingungen von 298 K und 100 Upm unterworfen, und die Änderung der Konzentration jeder organischen Verbindung mit der Zeit wurde durch Gaschromatographie gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 4 gezeigt.

Es ist aus Fig. 4 ersichtlich, daß nach 10 Tagen keine organische Verbindung mehr nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus hatte der Stamm YMCT-001 eine Zersetzungsaktivität gegenüber Kohlenstofftetrachlorid, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Tetrachlorethylen, Dichlorbenzol und polychloriertem Biphenyl (PCB).

Ausführungsform 2

Zuerst wurden hergestellt: Probe A, hergestellt durch Eingeben von 25 ml eines anorganischen Salze umfassenden Kulturmediums und Bakterienzellen aus 100 µl ($OD_{660} = 1,0$) eines flüssigen LB-Kulturmediums für den Stamm YMCT-001 in ein Glasfläschchen; Probe B, hergestellt durch Eingeben von Bakterienzellen aus 100 µl einer Suspension, die hergestellt worden war durch Konzentrieren mittels Zentrifugieren unter Erhalt einer Zahl von Bakterienzellen, die 25 mal größer war als in Probe A; Probe C, hergestellt durch Eingeben von Bakterienzellen aus 100 µl einer Suspension, die durch Zentrifugieren konzentriert worden war auf eine Zahl von Bakterienzellen, die 100 mal größer war als in Probe A; und Probe D, hergestellt durch Eingeben von Bakterienzellen aus 100 µl einer Suspension, die auf ein Viertel des Wertes in dem flüssigen LB-Kulturmedium ($OD_{660} = 1,0$) verdünnt worden war, das in Probe A verwendet worden war.

TCE wurde den jeweiligen Proben in einer Menge zugesetzt, daß die Konzentration an TCE in den Proben jeweils 1 ppm betrug. Die Proben wurden einer Schüttelkultur unter Bedingungen von 298 K und 100 Upm unterzogen. Während des Schüttelns wurde die Änderung der TCE-Konzentration mit der Zeit gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 5 gezeigt.

Es ist aus Fig. 5 ersichtlich, daß die Zeit für eine vollständige Zersetzung von TCE wesentlich verkürzt werden kann, indem man die Zahl der Bakterienzellen erhöht, die zu Beginn der Zersetzung von TCE in Kontakt mit

TCE sind.

Ausführungsform 3

Der Zersetzungs-Test wurde in derselben Weise wie in Ausführungsform 2 durchgeführt, mit der Ausnahme, daß die TCE-Konzentration auf 1 ppm, 2 ppm und 3 ppm geändert wurde, daß die cis-DCE-Konzentration auf 1 ppm, 5 ppm und 8 ppm geändert wurde, die trans-DCE-Konzentration auf 1 ppm und 2 ppm geändert wurde und daß Bakterienzellen aus 100 µl einer Suspension zugesetzt wurden, die auf das 25-Fache konzentriert worden war. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 6, Fig. 7 und Fig. 8 gezeigt. Aus diesen Figuren ist ersichtlich, daß der Stamm YMCT-001 ein Vermögen zur Zersetzung organischer Verbindungen in hohen Konzentrationen aufweist.

Ausführungsform 4

Zuerst wurden 25 ml eines anorganische Salze umfassenden Kulturmediums und Bakterienzellen aus 100 µl ($OD_{660} = 1,0$) eines flüssigen LB-Kulturmediums für den Stamm YMCT-001 in jedes Glasfläschchen gegeben. Darüber hinaus wurde Glucose in einer Menge von 0,18 mg/l, 18 mg/l und 1.800 mg/l sowie 10.000 mg/l (angegeben als gesamter organischer Kohlenstoff; total organic carbon; TOC) zugesetzt. Außerdem wurde eine Kontrollprobe ohne Glucose hergestellt. So wurden jeweils Proben E, F, G, H und I erhalten. TCE wurde den jeweiligen Proben in einer solchen Menge zugesetzt, daß die Gesamtkonzentration darin bei 1 ppm lag. Die Proben wurden jeweils einer Schüttelkultur unter Bedingungen von 298 K und 100 Upm unterworfen. Während der Zeit des Schüttelns wurde die Änderung der TCE-Konzentration mit der Zeit gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 9 gezeigt.

Es ist aus Fig. 9 ersichtlich, daß selbst dann, wenn TCE und Glucose nebeneinander vorhanden waren, der Stamm YMCT-001 Aktivität der Zersetzung von TCE bei den Glucose-Konzentrationen gemäß dieser Ausführungsform zeigte. Außerdem ergibt sich offensichtlich aus Fig. 9, daß dann, wenn Glucose in Mengen im Bereich von 0,18 mg/l bis 1.800 mg/l (angegeben als TOC) vorhanden ist, der Stamm YMCT-001 ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen in einem Ausmaß zeigt, das gleich dem Ausmaß oder höher als das Ausmaß ist, das dann vorliegt, wenn Glucose nicht zugegen ist.

Außer TCE zeigt der Stamm YMCT-001 auch eine im wesentlichen gleiche Aktivität der Zersetzung bei Kohlenstofftetrachlorid, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Tetrachlorethylen, Dichlorbenzol und polychloriertem Biphenyl (PCB).

Ausführungsform 5

Es wurde ein Zersetzungs-Test an cis-DCE durchgeführt, wobei man der Verfahrensweise von Ausführungsform 2 folgte, mit der Ausnahme, daß brauner Waldboden in einer Volumenmenge von 25 ml, der mit etwa 100 ppm cis-DCE kontaminiert war (100 mg cis-DCE/kg Erdreich), 10 ml eines anorganische Salze umfassenden Kulturmediums und Bakterienzellen aus 100 µl ($OD_{660} = 1,0$) eines flüssigen LB-Kulturmediums für den Stamm YMCT-001 in ein Glasfläschchen gegeben wurden (Konzentration von etwa 4 ppm cis-DCE in der Flüssigkeit). Als Ergebnis dieser Zersetzung konnte in dem Erdreich enthaltenes cis-DCE nach 7 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden.

Ausführungsform 6

Es wurde ein Zersetzungs-Test durchgeführt, wobei man der Verfahrensweise von Ausführungsform 2 folgte, mit der Ausnahme, daß etwa 2 ppm cis-DCE, 25 ml Grundwasser, das durch etwa 1 ppm TCE kontaminiert war, und Bakterienzellen aus 100 µl ($OD_{660} = 1,0$) eines flüssigen LB-Kulturmediums für den Stamm YMCT-001 in ein Glasfläschchen gegeben wurden. Als Ergebnis des Versuchs konnten cis-DCE und TCE nach 14 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden.

Ausführungsform 7

Der Stamm YMCT-001 wurde auf verschiedenen Arten von Trägern als immobilisiertes Bakterium gehalten, und es wurde ein Zersetzungs-Test an 10 ppm TCE durchgeführt. Die verwendeten Träger sind in Tabelle 2 gezeigt. Fig. 10 zeigt ein Beispiel (Träger: Calciumalginat-Gel) der Ergebnisse von Tests der Zersetzung von TCE durch die immobilisierten Bakterien. Verglichen mit Bakterien im freien Zustand konnte eine höhere Konzentration organischer Verbindungen in einer kurzen Zeit zersetzt werden, wenn man die immobilisierten Bakterien verwendete, wobei eine große Bakterienmenge mit dem zu zersetzenden TCE in Kontakt gebracht werden konnte.

Tabelle 2

5	Trägermaterialien zum Fixieren des Stamms YMCT-001	
	Gel	Calciumalginat-Gel Agarose-Gel Carrageen-Gel
10	Anorganisches Material	Poröses Aluminiumoxid-Keramikkmaterial Poröses Siliciumoxid-Keramikkmaterial Einkristallines Aluminiumoxid Einkristallines Siliciumoxid Glaskugeln
15	Organisches Material	Kollagen Fibroin Chitin Chitosan
20	Synthetisches Harz	Stereo-vernetzter Polyethylenkörper Stereo-vernetzter Polypropylenkörper Polyurethan Photo-härtendes Harz Polyelektrolyt-Verbundmaterial
25		
30		

Ausführungsform 8

35

Teflon-Filterpapier wurde in eine Suspension des Stamms YMCT-001 ($OD_{660} = 1,0$) eingetaucht und eine Schüttelkultur bei 25°C für die Zeit von 1 h durchgeführt. Anschließend wurde der Druck gesenkt und so der Stamm YMCT-001 in das Filterpapier transportiert. Da Wasser in dem Filterpapier unmittelbar nach Eintragen des Stamms YMCT-001 in das Papier enthalten war, wurde das Filtermaterial getrocknet und so die wasserabstoßenden Eigenschaften wiederhergestellt. So wurde ein Teflon-Filterpapier 111 hergestellt, das den Bakterienstamm YMCT-001 trug.

40

In der Zwischenzeit wurde Erdreich, das mit verschiedenen Arten organischer Verbindungen kontaminiert war, in einen Beton-Lysimeter-Behälter einer Größe von 400 cm × 400 cm × 800 cm gefüllt. Wie in Fig. 11 gezeigt ist, hatte das Erdreich, das in den Beton-Lysimeter-Behälter gefüllt worden war, einen gesättigten Bereich 115, der aus einem ungesättigten Bereich 112, einer permeablen Schicht 113 und einer kaum permeablen Schicht 114 (wie Erdreich in der Umgebung) bestand.

45

Das Teflon-Filterpapier 111, das den Stamm YMCT-001 trug, wurde in das Erdreich eingegraben und reichte damit bis in die kaum permeable Schicht 114. Der eingegrabene Zustand ist in Fig. 11 gezeigt. Die Konzentrationen an organischen Verbindungen im Erdreich waren die folgenden: TCE: 5 ppm; Toluol: 100 ppm; Phenol: 100 ppm; Vinylfluorid: 5 ppm.

50

Nach dem Eingraben des Teflon-Filterpapiers 111, auf dem der Stamm YMCT-001 aufgetragen war, in den Boden, wurde der Deckel des Beton-Lysimeter-Behälters geschlossen und mit einem Harz versiegelt. Im Verlauf der Zeit wurden Erdreich-Proben abgenommen, und es wurde die Konzentration jeder organischen Verbindung, die in dem Erdreich enthalten war, gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 12 gezeigt. Das Erdreich wurde bei einer Temperatur von 15°C gehalten.

55

Aus Fig. 12 ergibt sich offensichtlich, daß alle organischen Verbindungen der verschiedenen Typen, die in dem Erdreich enthalten waren, in dieser Ausführungsform vollständig zersetzt werden konnten.

Ausführungsform 9

60

Der Bakterienstamm YMCT-001 wurde in einen Tank 117 eines Bioreaktor-Systems 116 gefüllt, wie es in Fig. 13 gezeigt ist. Grundwasser, das durch verschiedene Arten organischer Verbindungen kontaminiert war, wurde in den Tank 117 über ein Zufuhrrohr 118 gefüllt, um so die organischen Verbindungen durch den Stamm YMCT-001 zu zersetzen. Die Anfangskonzentrationen der organischen Verbindungen im Grundwasser waren die folgenden: TCE: 5 ppm; Toluol: 100 ppm; Phenol: 100 ppm; Vinylfluorid: 1 ppm. Der Tank 117 hatte ein Fassungsvermögen von 2.000 l, seine Innentemperatur wurde bei 25°C gehalten, und der Tank war so konzipiert, daß das Grundwasser, in dem die darin enthaltenen organischen Verbindungen zersetzt worden waren, durch ein Auslaßrohr 119 abgelassen wurde. Die Konzentration jeder organischen Verbindung vor dem Einfüllen in das

65

Bioreaktor-System 116 und nach dem Ablassen aus dem Bioreaktor-System 116 wurde gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 14 gezeigt.

Es ist aus Fig. 14 ersichtlich, daß alle organischen Verbindungen der verschiedenen Typen, die in dem Grundwasser enthalten waren, vollständig und stabil in dieser Ausführungsform zersetzt werden konnten. Speziell die Wirksamkeit der Zersetzung von TCE, Toluol und Phenol war sehr gut.

5

Ausführungsform 10

Nach Auftragen des Stamms YMCT-001 auf Aktivkohle mit einem Teilchendurchmesser von etwa 5 mm wurde die Aktivkohle, die den Stamm YMCT-001 trug, in eine Trommel mit einem Innen-Fassungsvermögen von 1.000 ml gefüllt und so ein Biofilter 120 hergestellt. Ein cis-DCE und Vinylfluorid in einer Konzentration von etwa 1,2 g/m³ enthaltendes Gas wurde aus Erdreich 124 in das Biofilter 120 durch ein Einlaßrohr 121, ein Gebläse 122 und ein Zufuhrrohr 123 eingeleitet, wie dies in Fig. 15 gezeigt ist. Die Konzentration jeder organischen Verbindung vor und nach dem Einleiten in das Biofilter 120 wurde gemessen. Die Temperatur in dem Biofilter 120 wurde bei 25°C gehalten, und das Biofilter war so konzipiert, daß das Gas, in dem die darin enthaltenen organischen Verbindungen zersetzt worden waren, aus dem Filter durch ein Auslaßrohr 125 abgelassen wurde.

Die Ergebnisse sind in Fig. 16 gezeigt.

Es ist aus Fig. 16 ersichtlich, daß alle organischen Verbindungen der verschiedenen Typen, die in dem Gas enthalten waren, vollständig und stabil in dieser Ausführungsform zersetzt werden konnten.

In dieser Ausführungsform, in der der Stamm YMCT-001 auf Aktivkohle als einem Träger zugegen war, dauerte es 88 Tage bis zum Durchschlag der Aktivkohle. Wenn jedoch der Stamm YMCT-001 nicht auf der Aktivkohle als Träger aufgezogen war, dauerte es nur 28 Tage bis zum Durchschlag der Aktivkohle. Die organischen Verbindungen konnten daher im Rahmen dieser Ausführungsform über einen langen Zeitraum stabil und vollständig zersetzt werden.

25

Ausführungsform 11

Erdreich, das durch verschiedene Arten organischer Verbindungen kontaminiert war, wurde in einen Lysimeter-Behälter mit den Maßen 400 cm × 400 cm × 800 cm gefüllt, und es wurde ein Pumpwasser-Zirkulationssystem 126 installiert, wie es in Fig. 17 gezeigt ist. Das Erdreich, das in den Lysimeter-Behälter eingefüllt worden war, hatte einen gesättigten Bereich 115, der aus einem ungesättigten Bereich 112, einer permeablen Schicht 113 und einer kaum permeablen Schicht 114 bestand, wie bei Erdreich in der Umgebung. Die Anfangskonzentrationen der organischen Verbindungen in dem Erdreich waren die folgenden: TCE: 5 ppm; Toluol: 100 ppm; Phenol: 100 ppm und Vinylfluorid: 1 ppm. Das Pumpwasser wurde mit einer Rate von 1 m³/Tag im Kreislauf geführt. Der obere Teil des Lysimeter-Behälters wurde verschlossen und luftdicht mit einem Harz versiegelt. Der Stamm YMCT-001 wurde in das Erdreich über eine Mikroorganismen-Zufuhrvorrichtung 127 über ein Zufuhrrohr 128 injiziert, so daß die Konzentration an Bakterienzellen 10⁸ cfu pro 1 ml Erdreich war. Das Grundwasser wurde mit einer Pumpe 129 über ein Zufuhrrohr 130 umgepumpt und strömte innerhalb des Pumpwasser-Zirkulationssystems 126. Aktivkohle wurde nicht in den Aktivkohle-Adsorptionsturm 131 gefüllt, und eine organische Substanz wie Glukose wurde in dieser Ausführungsform über die Zufuhrvorrichtung 132 nicht zugeführt. Das Erdreich wurde bei einer Temperatur von 15°C gehalten. Die Konzentration jeder organischen Verbindung, die in dem Grundwasser enthalten war, das durch das Erdreich strömte, wurde gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 18 gezeigt.

Es ist aus Fig. 18 ersichtlich, daß alle organischen Verbindungen, die in verschiedenen Arten in dem Grundwasser enthalten waren, in dieser Ausführungsform vollständig und stabil zersetzt werden konnten.

45

Ausführungsform 12

Erdreich, das durch verschiedene Arten organischer Verbindungen kontaminiert war, wurde in einen Lysimeter-Behälter mit den Dimensionen 400 cm × 400 cm × 800 cm gefüllt. Reines Untergrundwasser wurde mit einer Rate von 0,01 m³/Tag umgepumpt und im Kreislauf geführt. Das Erdreich, das in den Lysimeter-Behälter gefüllt worden war, hatte einen gesättigten Bereich 115, der aus einem ungesättigten Bereich 112, einer permeablen Schicht 113 und einer kaum permeablen Schicht 114 bestand, wie sie in Erdreich in der Umwelt vorkommt. Die Anfangskonzentrationen der organischen Verbindungen im Erdreich waren die folgenden: TCE: 5 ppm; Toluol: 100 ppm; Phenol: 100 ppm und Vinylfluorid: 1 ppm. Der obere Teil des Lysimeter-Behälters wurde geschlossen und luftdicht mit einem Harz versiegelt.

Ein Zylinder 133, in den eine poröse Keramik-Substanz mit einem Teilchendurchmesser von etwa 5 mm enthalten war, die als Träger für den Stamm YMCT-001 diente, wurde in dem Erdreich vergraben. Der Zustand des eingegrabenen Materials ist in Fig. 19 gezeigt. Die Konzentration jeder organischen Verbindung, die in dem Grundwasser enthalten war, das durch das Erdreich strömte, wurde gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 20 gezeigt.

Es ergibt sich aus Fig. 20, daß alle organischen Verbindungen der verschiedenen Typen, die in dem Grundwasser enthalten waren, in dieser Ausführungsform vollständig und in stabiler Weise zersetzt werden konnten. Das Erdreich wurde bei einer Temperatur von 15°C gehalten.

65

Ausführungsform 13

Erdreich, das mit verschiedenen Arten organischer Verbindungen kontaminiert war, wurde in einen Lysime-

ter-Behälter gefüllt, der die Dimensionen 400 cm × 400 cm × 800 cm aufwies. Es wurde ein Reinigungssystem 134 installiert, wie es in Fig. 21 gezeigt ist.

Die Anfangskonzentration der organischen Verbindungen in dem Erdreich waren wie folgt TCE: 5 ppm; Toluol: 100 ppm; Phenol: 100 ppm; Vinylfluorid: 1 ppm. Der Stamm YMCT-001 wurde in das Erdreich aus einer Mikroorganismen-Zufuhrvorrichtung 135 durch ein Zufuhrrohr 136 und ein Einfüllrohr 137 injiziert, so daß die Konzentration an Bakterienzellen 10^8 cfu pro 1 ml Erdreich betrug. Eine organische Substanz wie Glucose wurde über die Zufuhrvorrichtung 138 nicht zugesetzt.

Nach Injizieren des Stamms YMCT-001 in das Erdreich wurde der obere Teil des Lysimeter-Behälters verschlossen und luftdicht mit einem Harz versiegelt. Proben des Erdreichs wurden im Verlauf der Zeit abgezogen und darin die Konzentration jeder der in dem Erdreich enthaltenen organischen Verbindungen gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 22 gezeigt. Die Temperatur des Erdreichs wurde bei 15°C gehalten.

Es ergibt sich aus Fig. 22, daß alle organischen Verbindungen der verschiedenen Typen, die in dem Erdreich enthalten waren, in dieser Ausführungsform vollständig zersetzt werden konnten.

Wie oben beschrieben, können nach dem Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung die organischen Verbindungen in sicherer und effizienter Weise unter Verwendung der Mikroorganismen zersetzt werden, die ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen und die aus der kontaminierten Umgebung isoliert werden. Die Mikroorganismen weisen Toleranz gegenüber organischen Verbindungen auf und benötigen keinen Zusatz, keine induzierende Substanz oder liefern keine für die Umgebung gefährlichen mutagenisierten Bakterien. Daher kann das kontaminierte Erdreich oder das kontaminierte Grundwasser in situ wieder in den Ausgangszustand zurückgeführt werden, ohne daß dabei eine Sekundärkontamination hervorgerufen wird. Da die Mikroorganismen selbst von der kontaminierten Umgebung abgeleitet bzw. aus dieser entnommen werden, besteht keine Möglichkeit, daß der Mikroorganismus eine Sekundärkontamination hervorruft.

Die Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen gemäß der Erfindung ist so aufgebaut, daß die organischen Verbindungen durch die Mikroorganismen zersetzt werden, die ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweisen und die aus der kontaminierten Umgebung isoliert werden. Die Mikroorganismen weisen Toleranz gegenüber organischen Verbindungen auf. So können die organischen Verbindungen sicher und wirksam zersetzt werden, ohne daß die Mikroorganismen hierzu den Zusatz eines Additivs oder einer induzierenden Substanz benötigen und ohne daß für die Umgebung gefährliche mutagenisierte Bakterien freigesetzt werden. Dadurch kann das kontaminierte Erdreich oder das kontaminierte Grundwasser in den ursprünglichen Zustand zurück überführt werden, ohne daß eine Sekundär-Kontamination hervorgerufen wird. Da der Mikroorganismus selbst aus der kontaminierten Umgebung abgeleitet bzw. entnommen ist, besteht keine Möglichkeit, daß der Mikroorganismus eine Sekundär-Kontamination hervorruft.

Nach den Verfahren zum Isolieren von Mikroorganismen gemäß der vorliegenden Erfindung können die Mikroorganismen, die bei dem biologischen Abbau organischer Verbindungen wirksam sind, effizient isoliert werden.

Darüber hinaus zersetzt der neue Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung in effizienter Weise verschiedene Arten organischer Verbindungen, ohne daß er den Zusatz weiterer Additive oder induzierender Substanzen benötigt, die gefährlich für die Umwelt sein könnten. Daher kann eine praktisch anwendbare Technik zur Wiederherstellung der Umwelt geschaffen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen, umfassend die Schritte, daß man
 - einen Mikroorganismus, der aus der Umgebung entnommen ist, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder eine Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, mit der ersten und/oder einer zweiten organischen Verbindung in Kontakt bringt; und
 - die erste und/oder die zweite organische Verbindung mit dem Mikroorganismus zersetzt.
2. Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen, das die Schritte umfaßt, daß man
 - einen Mikroorganismus aus der Umgebung gewinnt, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder eine mit der Umgebung in Kontakt stehende Probe gewinnt;
 - den gewonnenen Mikroorganismus kultiviert, wobei seine Toleranz gegenüber organischen Verbindungen als Index verwendet wird;
 - den kultivierten Mikroorganismus selektiert;
 - den selektierten Mikroorganismus unter Berücksichtigung seiner Fähigkeit zum Zersetzen organischer Verbindungen als Index erneut selektiert;
 - den erneut selektierten Mikroorganismus mit der ersten organischen Verbindung und/oder mit einer zweiten organischen Verbindung in Kontakt bringt; und
 - die erste und/oder die zweite organische Verbindung mittels des Mikroorganismus zersetzt.
3. Verfahren zum Zersetzen organischer Verbindungen, das die Schritte umfaßt, daß man
 - einen Mikroorganismus aus der Umgebung gewinnt, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder eine mit der Umgebung in Kontakt stehende Probe gewinnt;
 - den gewonnenen Mikroorganismus unter Bedingungen der Existenz der ersten organischen Verbindung kultiviert, wie sie in der Umgebung oder bei der Probe vorliegen, die mit der Umgebung in Kontakt steht;
 - den kultivierten Mikroorganismus selektiert;
 - den selektierten Mikroorganismus unter Berücksichtigung seiner Fähigkeit zum Zersetzen organi-

- scher Verbindungen als Index erneut selektiert;
- den erneut selektierten Mikroorganismus mit der ersten organischen Verbindung und/oder mit einer zweiten organischen Verbindung in Kontakt bringt; und
 - die erste und/oder die zweite organische Verbindung mittels des Mikroorganismus zersetzt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin der Mikroorganismus ein Mikroorganismus ist, der mit den organischen Verbindungen als Kohlenstoff-Quelle gezüchtet werden kann. 5
 5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die organischen Verbindungen halogenierte Kohlenwasserstoffe und/oder aromatische Kohlenwasserstoffe sind.
 6. Verfahren nach Anspruch 5, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl. 10
 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin der Mikroorganismus wenigstens ein Mikroorganismus ist, der gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter.
 8. Verfahren nach Anspruch 7, worin der Mikroorganismus ein Bakterium ist, das zur Art Komagatella brevis gehört. 15
 9. Verfahren nach Anspruch 8, worin das Bakterium der Art Komagatella brevis der Stamm YMCT-001 ist, bevorzugt der Stamm, der unter der Hinterlegungs-Nr. FERM BP-5282 hinterlegt wurde.
 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin die erste organische Verbindung ein halogenierter Kohlenwasserstoff und/oder aromatischer Kohlenwasserstoff ist.
 11. Verfahren nach Anspruch 10, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl. 20
 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, worin die zweite organische Verbindung ein halogenierter Kohlenwasserstoff und/oder aromatischer Kohlenwasserstoff ist.
 13. Verfahren nach Anspruch 12, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl. 25
 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, worin der Schritt des In-Kontakt-Bringens des Mikroorganismus mit der ersten und/oder der zweiten organischen Verbindung durchgeführt wird in der mit der organischen Verbindung kontaminierten Umgebung.
 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin der Schritt des Kultivierens durchgeführt wird unter solchen Bedingungen, daß die Konzentration der organischen Verbindung(en) in der Gasphase 50 bis 10.000 ppm wird. 30
 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin der Schritt des Kultivierens unter Verwendung eines festen Kulturmediums unter solchen Bedingungen durchgeführt wird, daß die Konzentration der organischen Verbindung(en) in der Gasphase 50 bis 10.000 ppm wird.
 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, worin der Schritt des Kultivierens durchgeführt wird unter Bedingungen einer Temperatur von 277 bis 313 K, eines pH-Wertes von 6,0 bis 8,5 und einer Sauerstoffkonzentration, die unter einem Sauerstoff-Partialdruck von 0,2 bis 21% gesättigt ist.
 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin der erneute Selektionsschritt durchgeführt wird unter solchen Bedingungen, daß die Gasphasen-Konzentration der organischen Verbindung(en) 50 bis 10.000 ppm wird. 35
 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin der erneute Selektionsschritt durchgeführt wird unter Verwendung eines flüssigen Kulturmediums unter solchen Bedingungen, daß die Konzentration der organischen Verbindung(en) in der flüssigen Phase nicht weniger als 500 ppm wird.
 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin der erneute Selektionsschritt durchgeführt wird unter Bedingungen einer Temperatur von 277 bis 313 K, eines pH-Wertes von 6,0 bis 8,5 und einer Sauerstoffkonzentration, die unter einem Sauerstoff-Partialdruck von 0,2 bis 21% gesättigt ist. 40
 21. Vorrichtung zum Zersetzen organischer Verbindungen, umfassend
 - eine Einrichtung zum Halten eines Mikroorganismus, der aus der Umgebung abgeleitet bzw. entnommen ist, die mit einer ersten organischen Verbindung kontaminiert ist, oder einer Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist; und
 - eine Einrichtung zum In-Kontakt-Bringen des Mikroorganismus, der von der Vorrichtung zum Halten gehalten wird, mit der ersten und/oder einer zweiten organischen Verbindung. 45

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, worin der Mikroorganismus mit organischen Verbindungen als Kohlenstoff-Quelle gezüchtet werden kann.
23. Vorrichtung nach Anspruch 22, worin die organischen Verbindungen halogenierte Kohlenwasserstoffe und/oder aromatische Kohlenwasserstoffe sind.
24. Vorrichtung nach Anspruch 23, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, worin der Mikroorganismus wenigstens ein Mikroorganismus ist, der gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter.
26. Vorrichtung nach Anspruch 25, worin der Mikroorganismus ein Bakterium ist, das zur Art Komagatella brevis gehört.
27. Vorrichtung nach Anspruch 26, worin das Bakterium der Art Komagatella brevis der Stamm YMCT-001 ist, bevorzugt der Stamm, der unter der Hinterlegungs-Nr. FERM BP-5282 hinterlegt wurde.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 27, worin die erste organische Verbindung ein halogenierter Kohlenwasserstoff und/oder aromatischer Kohlenwasserstoff ist.
29. Vorrichtung nach Anspruch 28, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl.
30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 27, worin die zweite organische Verbindung ein halogener Kohlenwasserstoff und/oder aromatischer Kohlenwasserstoff ist.
31. Vorrichtung nach Anspruch 30, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl.
32. Vorrichtung nach Anspruch 21, worin die Einrichtung zum Halten des Mikroorganismus eine Einrichtung ist, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus einer hydrophoben porösen Membran, einem Tank, einem Filter und einem durchlässigen Zylinder.
33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 30, worin die Einrichtung zum Halten des Mikroorganismus in die Umgebung eingesetzt wird.
34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 33, worin die Einrichtung zum Halten des Mikroorganismus unter bestimmten Bedingungen gehalten wird.
35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 34, worin die Einrichtung zum Halten des Mikroorganismus gehalten wird unter Bedingungen einer Temperatur von 277 bis 313 K, eines pH-Wertes von 6,0 bis 8,5 und einer Sauerstoffkonzentration, die unter einem Sauerstoff-Partialdruck von 0,2 bis 21% gesättigt ist.
36. Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus, das die Schritte umfaßt, daß man
- einen Mikroorganismus aus der Umgebung, die mit organischen Verbindungen kontaminiert ist, oder einer Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht, gewinnt;
 - den gewonnenen Mikroorganismus in der Weise kultiviert, daß seine Toleranz gegenüber organischen Verbindungen als Index verwendet wird;
 - den kultivierten Mikroorganismus selektiert; und
 - den selektierten Mikroorganismus unter Berücksichtigung seiner Fähigkeit zum Zersetzen organischer Verbindungen als Index erneut selektiert.
37. Verfahren zum Isolieren eines Mikroorganismus, das die Schritte umfaßt, daß man
- einen Mikroorganismus aus der Umgebung, die mit organischen Verbindungen kontaminiert ist, oder einer Probe, die mit der Umgebung in Kontakt steht, gewinnt;
 - den gewonnenen Mikroorganismus unter der Bedingung des Vorhandenseins der organischen Verbindung kultiviert;
 - den kultivierten Mikroorganismus selektiert; und
 - den selektierten Mikroorganismus unter Berücksichtigung seiner Fähigkeit zum Zersetzen organischer Verbindungen als Index erneut selektiert.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 oder 37, worin der Mikroorganismus ein Mikroorganismus ist, der mit den organischen Verbindungen als Kohlenstoff-Quelle gezüchtet werden kann.
39. Verfahren nach Anspruch 38, worin die organischen Verbindungen halogenierte Kohlenwasserstoffe und/oder aromatische Kohlenwasserstoffe sind.
40. Verfahren nach Anspruch 39, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen,

- trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 40, worin der Mikroorganismus wenigstens ein Mikroorganismus ist, der gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter.
42. Verfahren nach Anspruch 41, worin der Mikroorganismus ein Bakterium ist, das zur Art Komagatella brevis gehört.
43. Verfahren nach Anspruch 42, worin das Bakterium der Art Komagatella brevis der Stamm YMCT-001 ist, bevorzugt der Stamm, der unter der Hinterlegungs-Nr. FERM BP-5282 hinterlegt wurde.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 43, worin die organische Verbindung ein halogenierter Kohlenwasserstoff und/oder aromatischer Kohlenwasserstoff ist.
45. Verfahren nach Anspruch 44, worin der/die halogenierte(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Trichlorethylen, cis-Dichlorethylen, trans-Dichlorethylen, 1,1-Dichlorethylen, Tetrachlorethylen, Dichlorethan, Trichlorethan, Tetrachlorethan, Vinylchlorid, Kohlenstofftetrachlorid, Vinylfluorid, Vinylbromid, 3,3,3-Trifluor-2-propen, 2,3-Dichlorhexafluor-2-buten und/oder worin der/die aromatische(n) Kohlenwasserstoff(e) wenigstens eine Verbindung ist/sind, die gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Dichlorbenzol, Trichlorbenzol, Brombenzol, 1-Bromnaphthalin und polychloriertem Biphenyl.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 45, worin der Schritt des Kultivierens durchgeführt wird unter solchen Bedingungen, daß die Konzentration der organischen Verbindung(en) in der Gasphase 50 bis 10.000 ppm wird.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 45, worin der Schritt des Kultivierens unter Verwendung eines festen Kulturmediums unter solchen Bedingungen durchgeführt wird, daß die Konzentration der organischen Verbindung(en) in der Gasphase 50 bis 10.000 ppm wird.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 45, worin der Schritt des Kultivierens durchgeführt wird unter Bedingungen einer Temperatur von 277 bis 313 K, eines pH-Wertes von 6,0 bis 8,5 und einer Sauerstoffkonzentration, die unter einem Sauerstoff-Partialdruck von 0,2 bis 21% gesättigt ist.
49. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 48, worin der erneute Selektionsschritt durchgeführt wird unter solchen Bedingungen, daß die Gasphasen-Konzentration der organischen Verbindung(en) 50 bis 10.000 ppm wird.
50. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 49, worin der erneute Selektionsschritt durchgeführt wird unter Verwendung eines flüssigen Kulturmediums unter solchen Bedingungen, daß die Konzentration der organischen Verbindung(en) in der flüssigen Phase nicht weniger als 500 ppm wird.
51. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 48, worin der erneute Selektionsschritt durchgeführt wird unter Bedingungen einer Temperatur von 277 bis 313 K, eines pH-Wertes von 6,0 bis 8,5 und einer Sauerstoffkonzentration, die unter einem Sauerstoff-Partialdruck von 0,2 bis 21% gesättigt ist.
52. Neuer Mikroorganismus, der isoliert ist und ein Vermögen zum Zersetzen organischer Verbindungen aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß er zu den Genus Komagatella, Arthrobacter, Brevibacter, Clavibacter, Mycobacterium, Renibacterium oder Terrabacter gehört.
53. Neuer Mikroorganismus nach Anspruch 52, kultiviert in Gegenwart einer oder mehrerer organischer Verbindung(en).
54. Neuer Mikroorganismus nach Anspruch 52 oder 53, wobei der Mikroorganismus ein Bakterium ist, das zur Art Komagatella brevis gehört.
55. Neuer Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 52 bis 54, worin der Mikroorganismus der Art Komagatella brevis der Stamm YMCT-001 ist, bevorzugt der Stamm, der unter der Hinterlegungs-Nr. FERM BP-5282 hinterlegt wurde.
56. Neuer Mikroorganismus, der isoliert wurde und in der Weise identifiziert wurde, daß er alle charakteristischen Identifikations-Merkmale des Mikroorganismus mit der Hinterlegungs-Nummer YMCT-001 (FERM PB-5282) aufweist.

Hierzu 19 Seite(n) Zeichnungen

FIG. 1

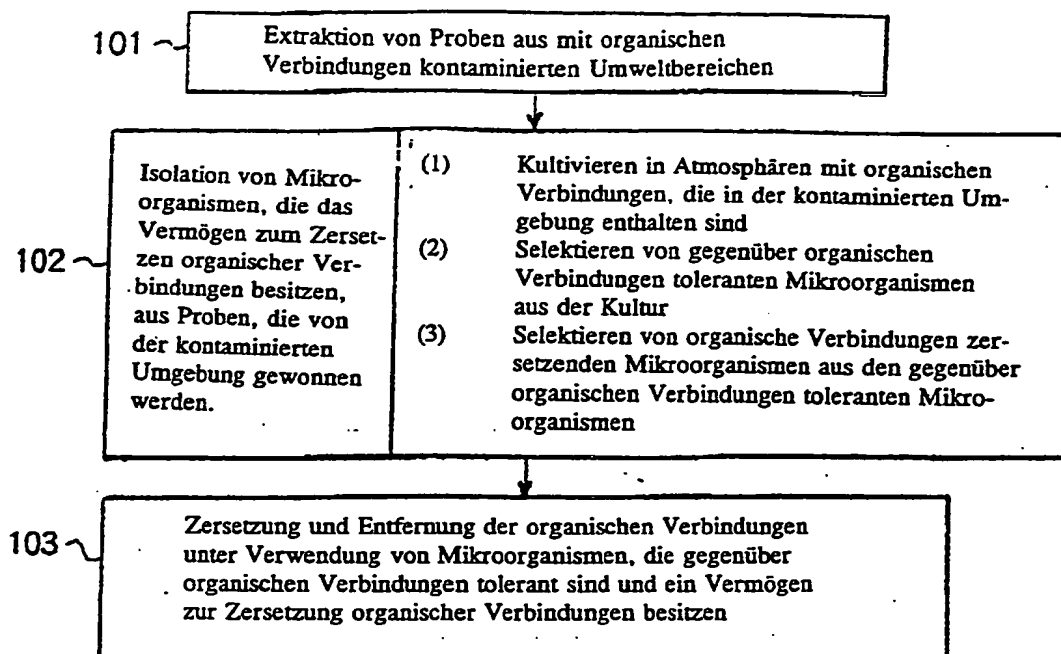


FIG. 2

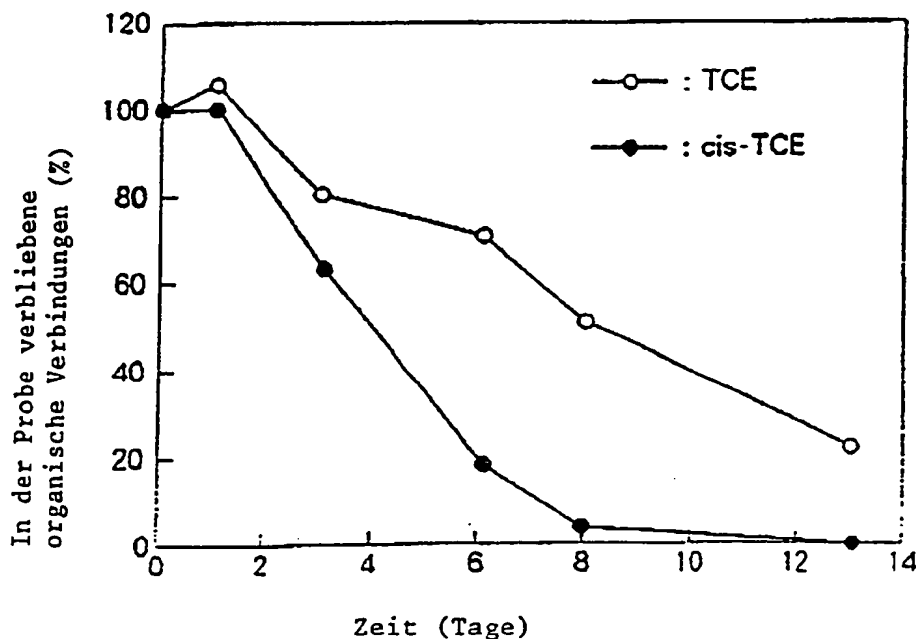


FIG. 3

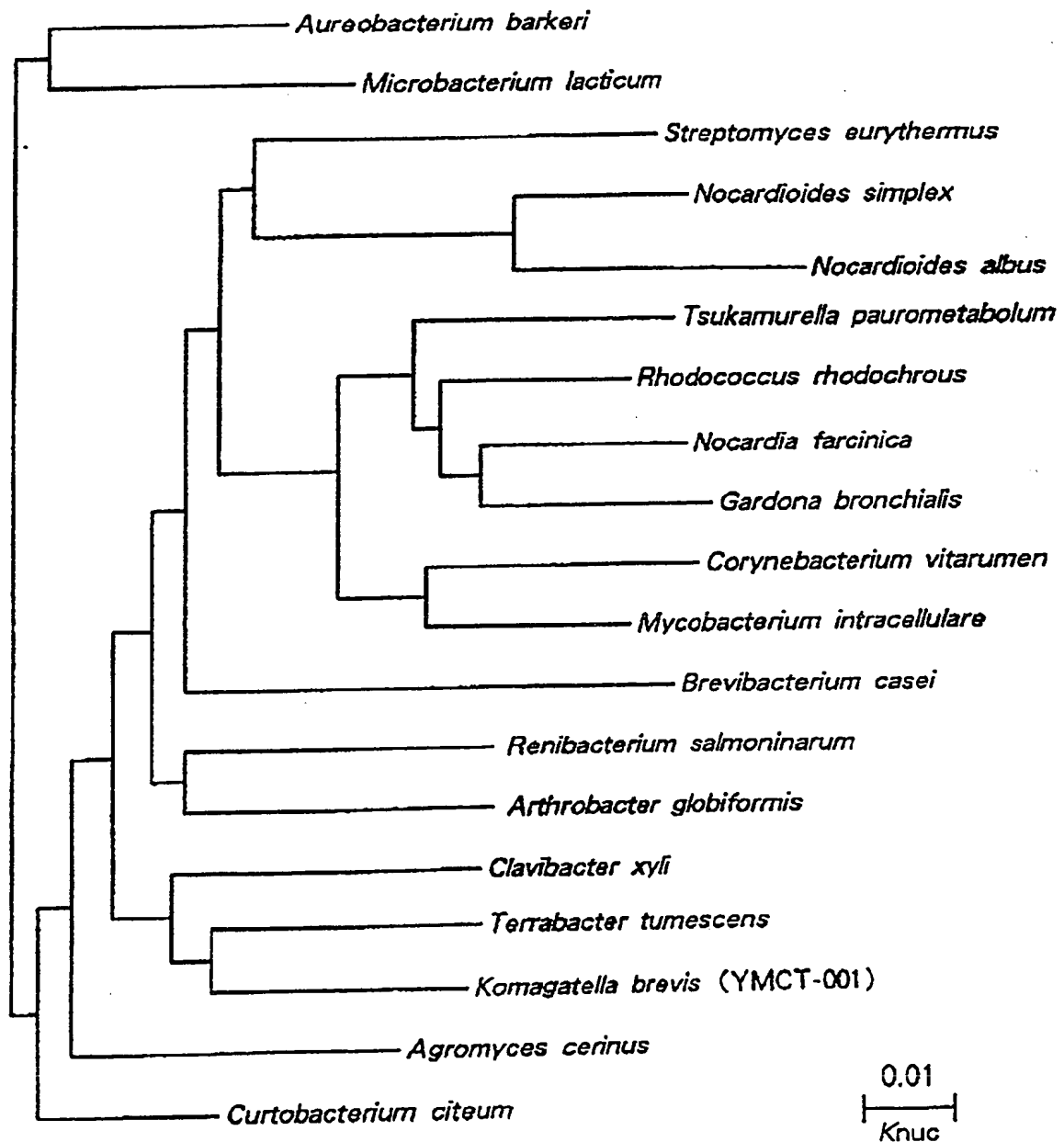


FIG. 4

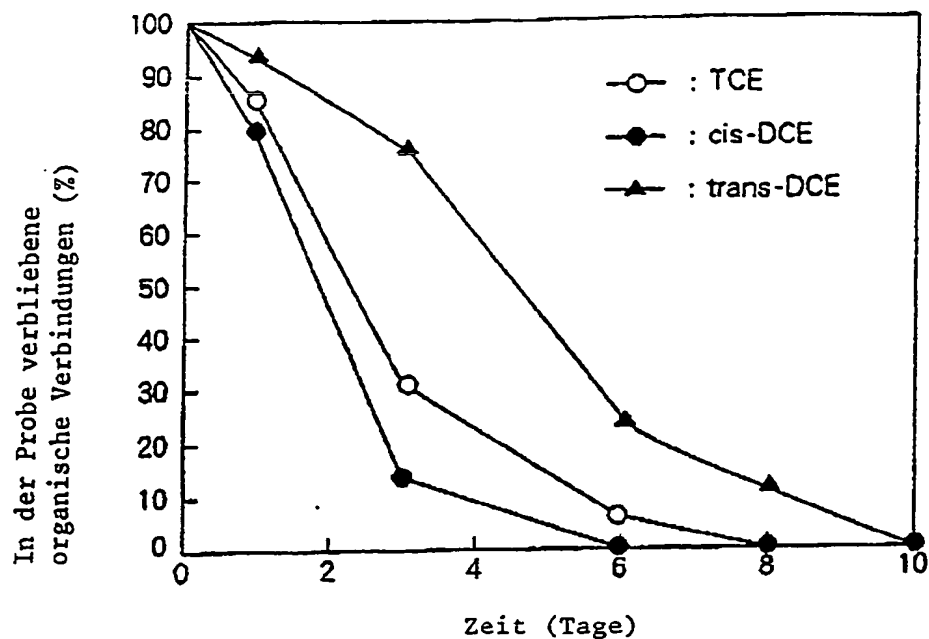


FIG. 5

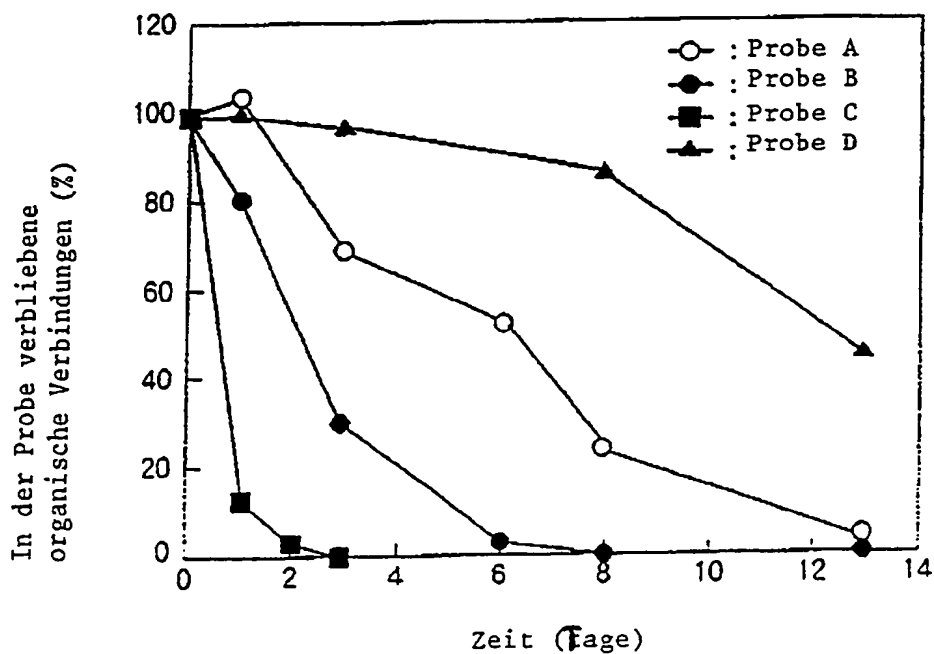


FIG. 6

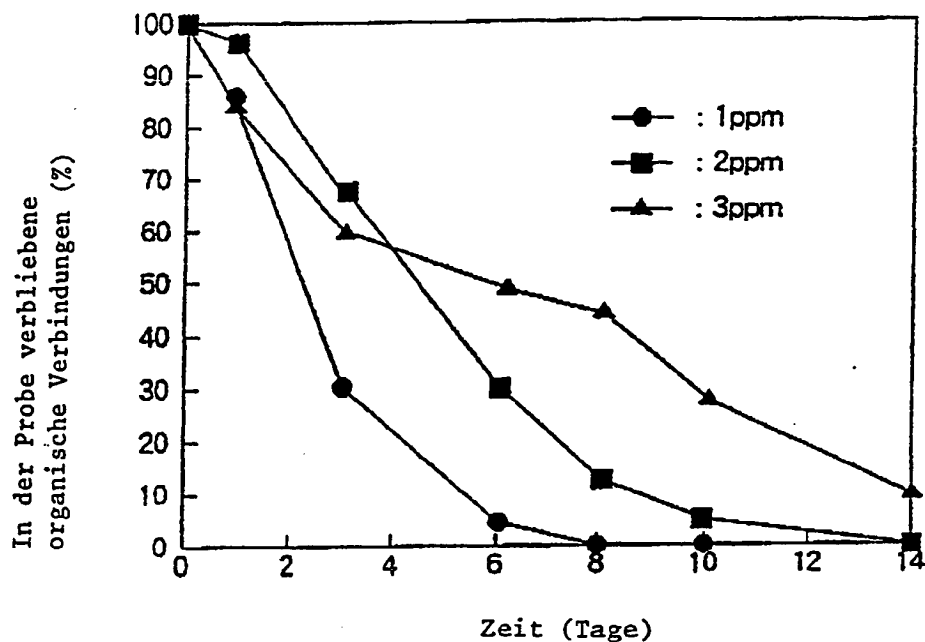


FIG. 7

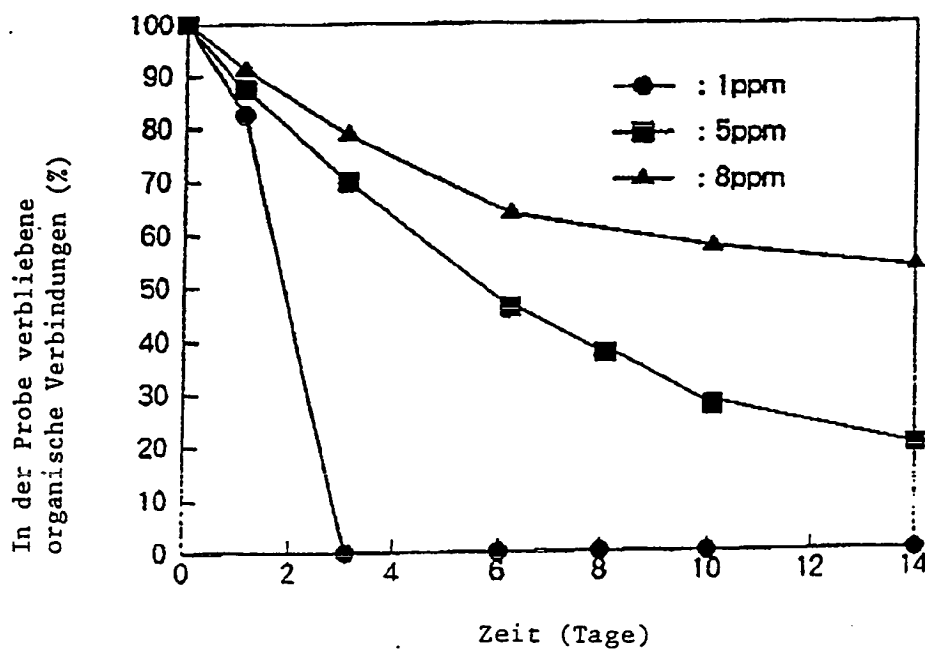


FIG. 8

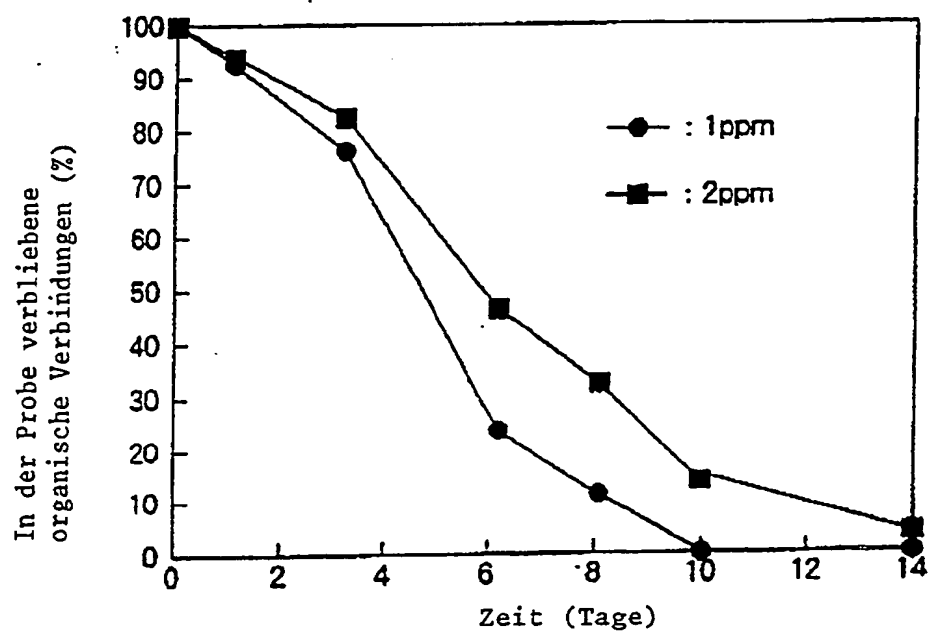


FIG. 9

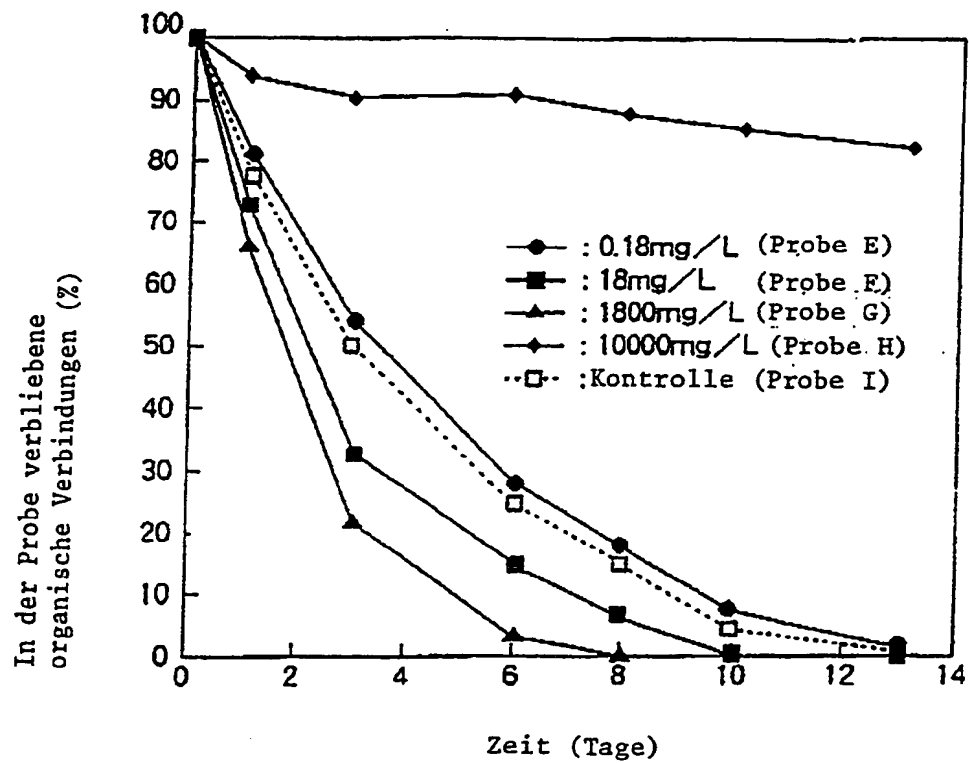


FIG. 10

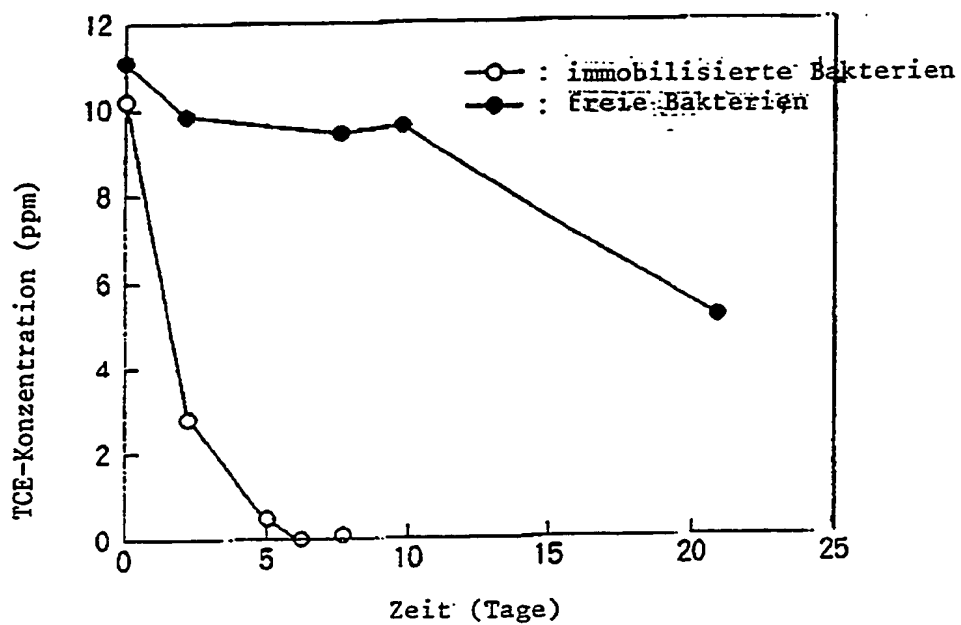


FIG. 11

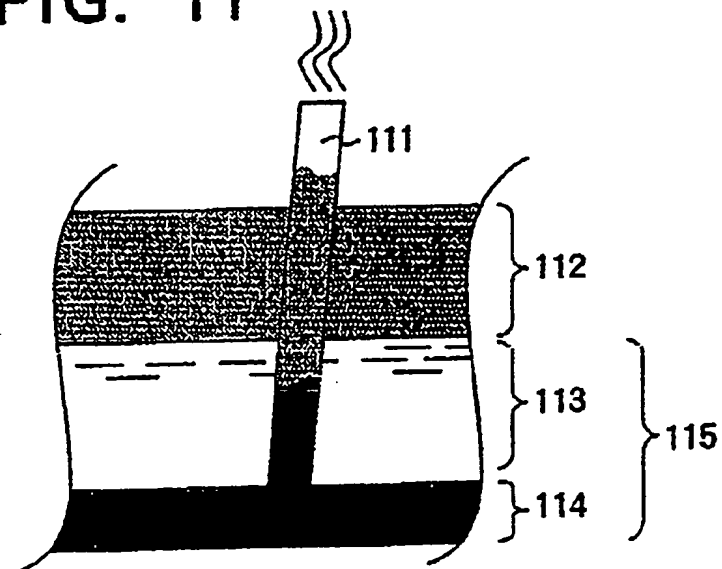


FIG. 12

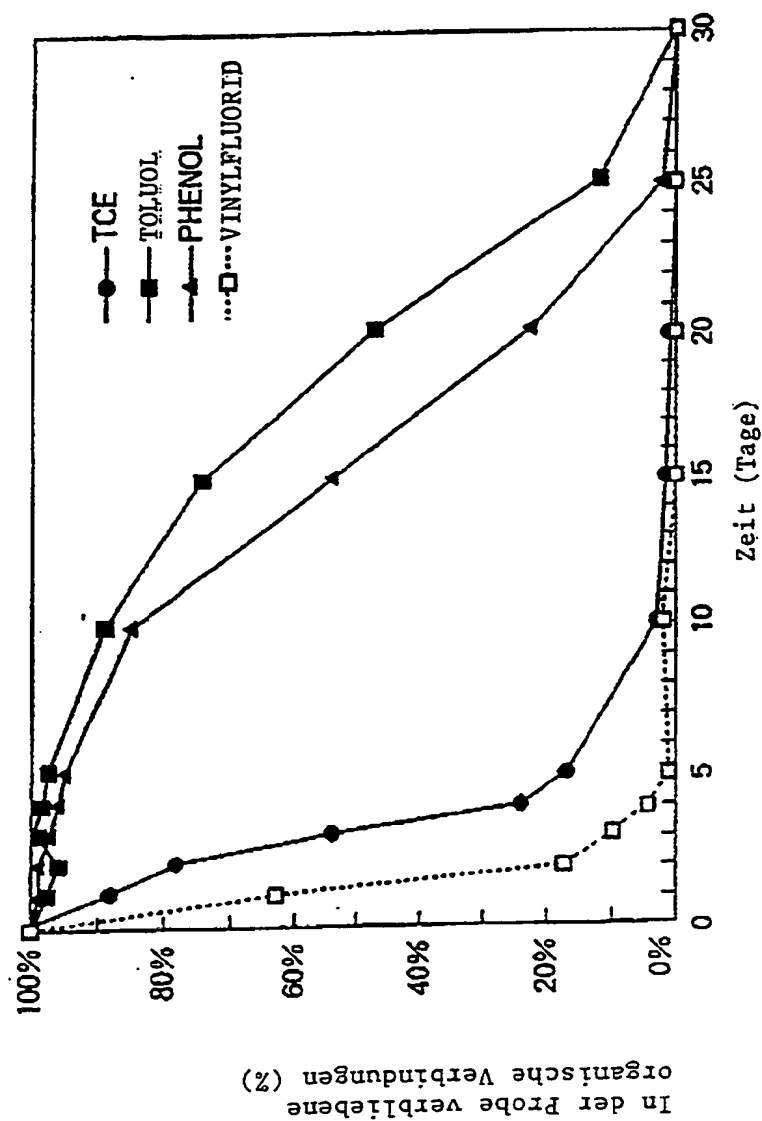


FIG. 13

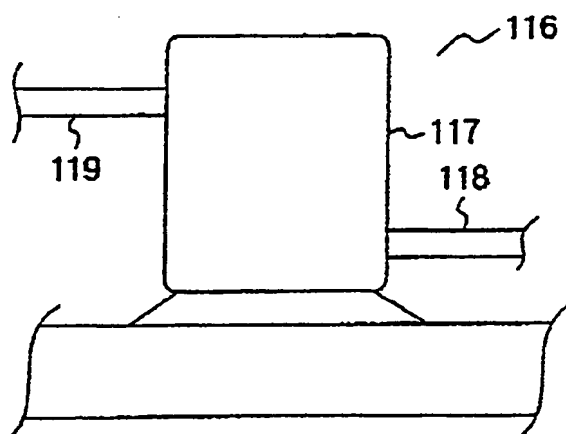


FIG. 14

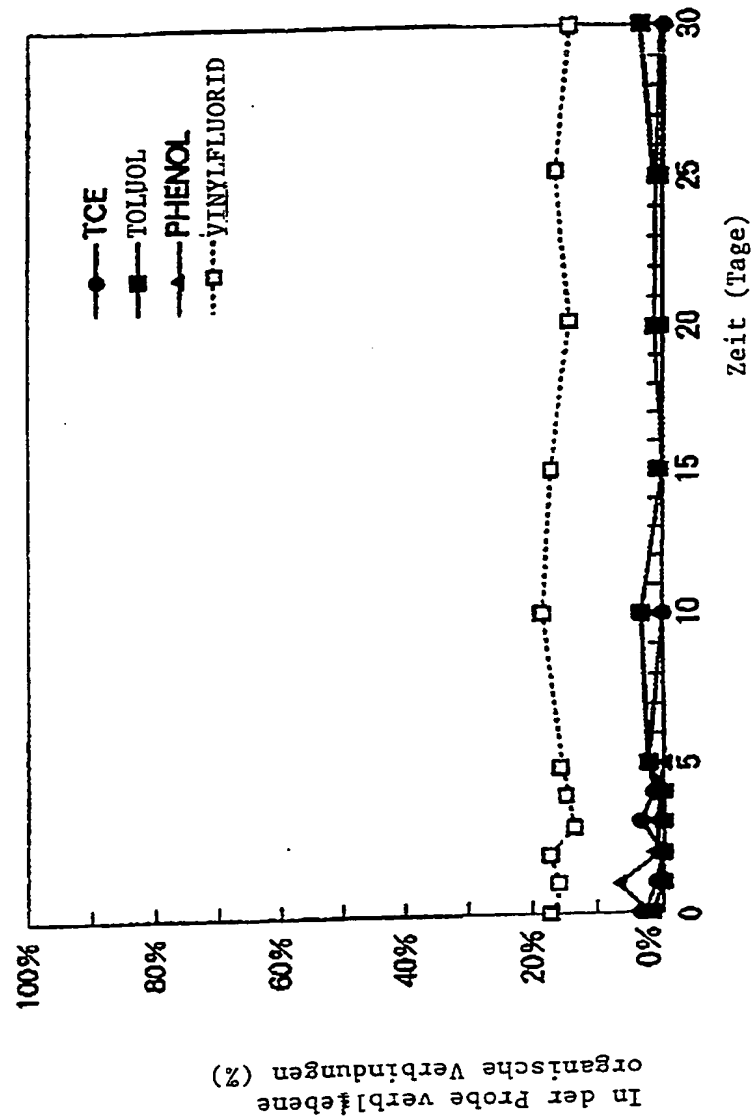


FIG. 15

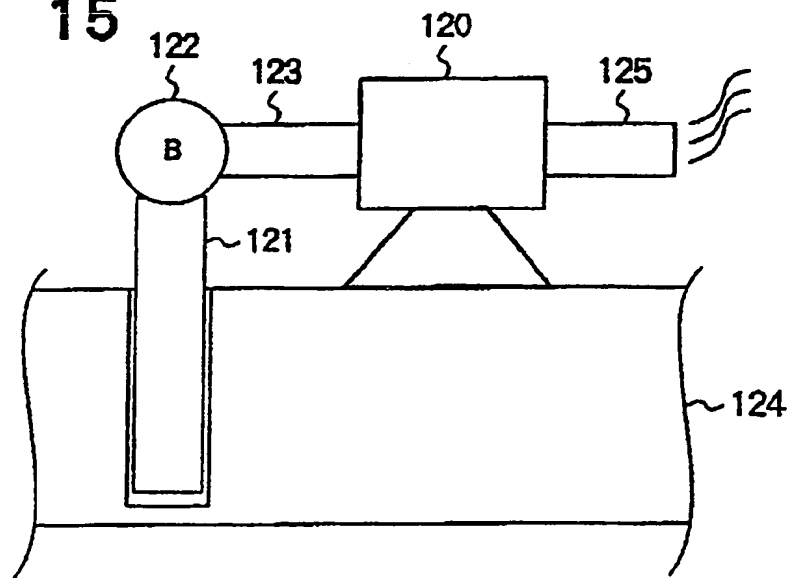


FIG. 16

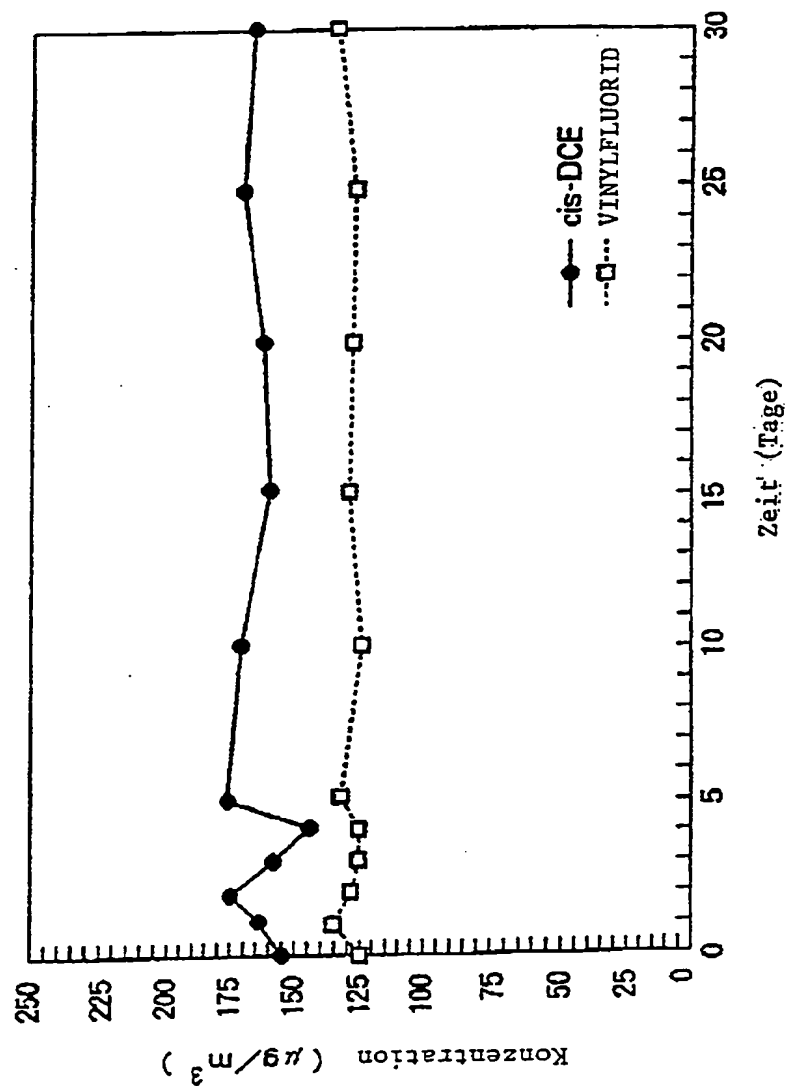


FIG. 17

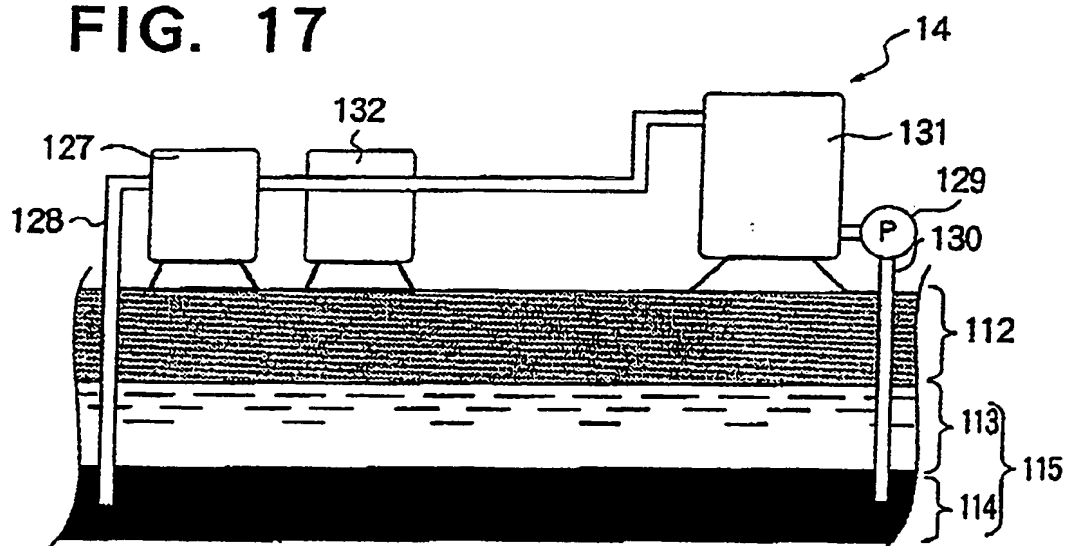


FIG. 18

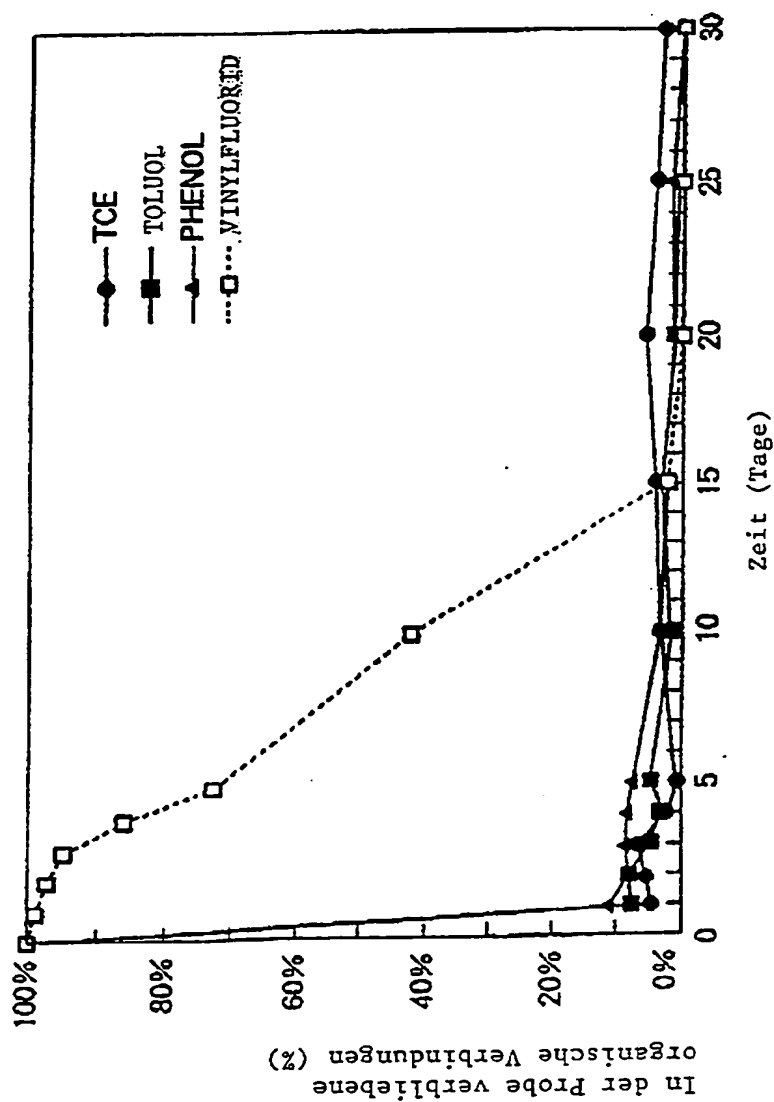


FIG. 19

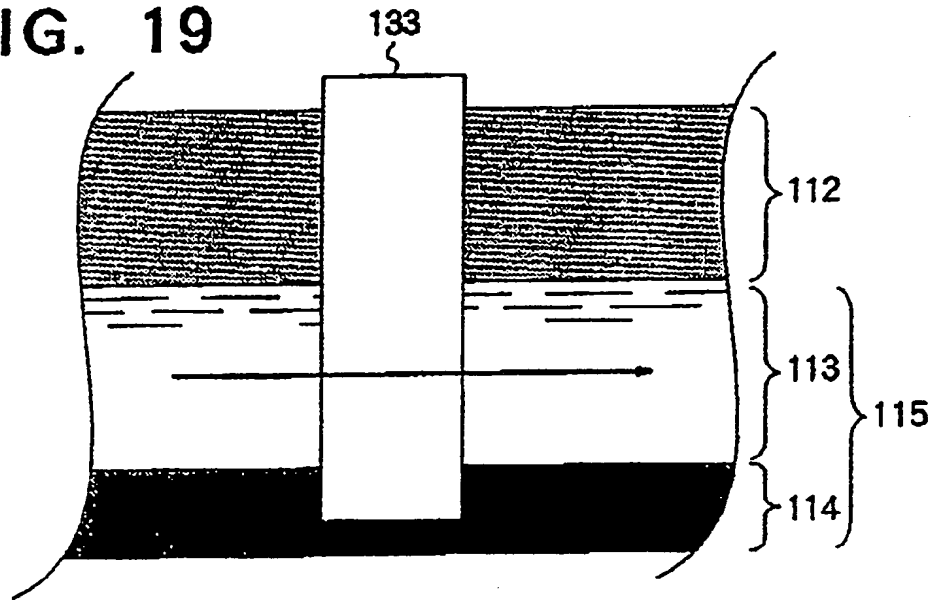


FIG. 20

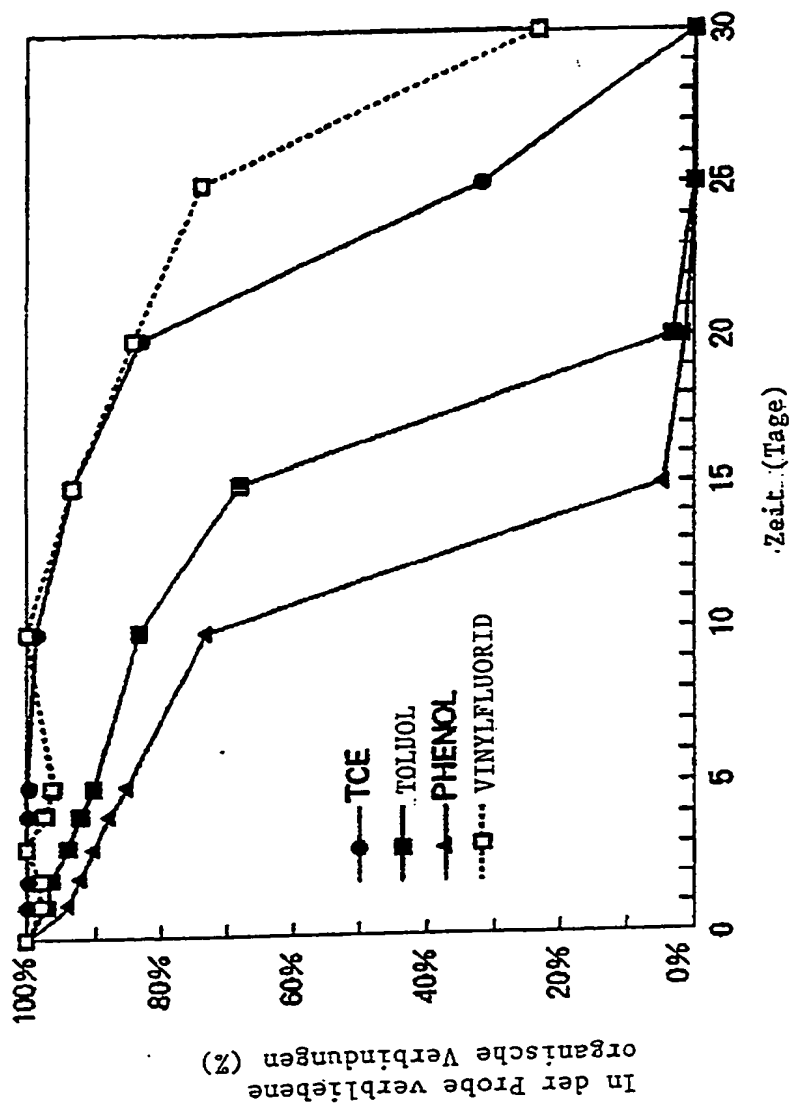


FIG. 21

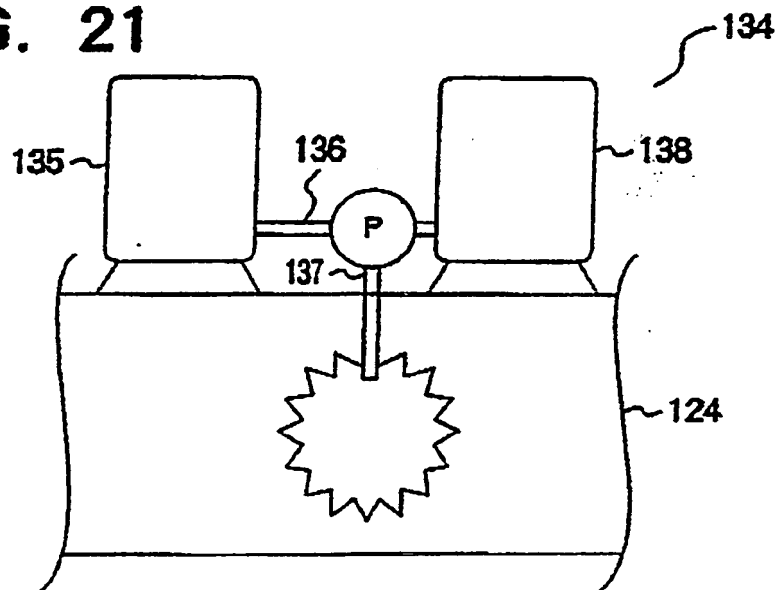


FIG. 21

